



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

Complejos ciclotmetalados de rutenio: efecto sobre la glucosa oxidasa y diseño de un ligante para su conjugación con compuestos Metal-TAML (ligante tetraamido *macro*cíclico)

TESIS PARA GRADUACIÓN POR
EXAMEN PROFESIONAL
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Rafael Omar Saavedra Díaz

TUTOR

Dr. Ronan Le Lagadec
Instituto de Química UNAM

COMITÉ TUTOR

Dr. Anatoly Yatsimirsky
Facultad de Química, UNAM
Dra. María de Jesús Rosales Hoz
Cinvestav, Departamento de Química

MÉXICO D.F. NOVIEMBRE, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Anatoly Yatsimirsky	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Martha Elena Sosa Torres	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Alexander D. Ryabov	Universidad de Carnegie Mellon, Pittsburgh, USA
Vocal	Dr. Luis Demetrio Miranda Gutiérrez	Instituto de Química, UNAM
Secretario	Dr. Ivan Castillo Pérez	Instituto de Química, UNAM

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio de Química Inorgánica 2

Instituto de Química, UNAM

NOMBRE DEL TUTOR

Dr. Ronan Le Lagadec

Instituto de Química, UNAM

SUSTENTANTE

M. en C. Rafael Omar Saavedra Díaz

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM.

Al doctor Ronan Le Lagadec, por su guía, paciencia y conocimiento que ha dedicado hacia mí y principalmente por brindarme su valiosa amistad.

Al doctor Alexander D. Ryabov por todo el apoyo y las enseñanzas que recibí de él, a partir de mi estancia de investigación en Mellon Institute de la universidad Carnegie Mellon en Pittsburgh PA.

Al doctor Terrence Collins por permitirme realizar la estancia de investigación con su grupo de trabajo y al doctor Longzhu Shen por sus valiosas aportaciones a este proyecto.

A los miembros de mi comité tutor, el Dr. Anatoly Yatsimirsky y la Dra. María de Jesús Rosales Hoz, por el interés y los consejos brindados que me ayudaron durante todo este proceso.

A los miembros del jurado por el tiempo invertido y su disposición de apoyarme para que yo pudiera finalizar este ciclo.

A la M. en C. Virginia Gómez Vidales por su ayuda con la interpretación y explicación de los espectros EPR.

A mis padres y hermanos con quienes siempre he podido contar sin reservas ni condiciones.

A los compañeros de laboratorio que con su compañía me brindaron fuerza para continuar.

A todas las personas que me permitieron compartir un poco de su vida y puedo con gusto llamarlos amigos porque convirtieron este sinuoso camino en una gran aventura.

Al CONACyT por la beca otorgada para los estudios de doctorado (No. de registro 153151) y la beca mixta otorgada para la realización de una estancia en Mellon Institute de la Universidad Carnegie Mellon en Pittsburg PA, EEUU.

A DGAPA por el financiamiento (PAPIIT Proyecto IN204812).

Parte del trabajo desarrollado en esta tesis se presentó en los siguientes congresos:

16th International Conference on Biological Inorganic Chemistry

Julio de 2013, Grenoble, Francia.

Poster: "Rutenacycles as effectors of Glucose Oxidase activity: inhibition by Ru^{II} and activation by Ru^{III}"

6° Encuentro de Química Inorgánica

Junio de 2013, Puebla, México

Poster: "Complejos de rutenio como efectores de la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* en la oxidación de β-D-glucosa"

QUIMIUNAM 2013

Noviembre de 2013, Ciudad Universitaria, México D.F.

Presentación oral: "Cyclometalated Ru^{II} complexes coupled with a Co^{III} tetraamidochelate system"

Instituto de Química UNAM simposio interno 2014

Enero de 2014

Presentación oral: "Complejos ciclometalados de rutenio como efectores de la glucosa oxidasa"

Parte del trabajo desarrollado en esta tesis se encuentra contenido en los siguientes artículos:

Rafael Omar Saavedra-Díaz, Ronan Le Lagadec, Alexander D. Ryabov "2-Phenylpyridine ruthenacycles as effectors of glucose oxidase activity: inhibition by Ru^{II} and activation by Ru^{III}" *J. Biol. Inorg. Chem.* **2013**, 18, 547-555.

Rafael Omar Saavedra-Díaz, Ronan Le Lagadec, Longzhu Q. Shen, Alexander D. Ryabov "In search for chelating TAML's (tetraamido macrocyclic ligands) with peripheral bidentate donor centers: a cobalt(III) complex of the 3,3'-(2,2'-bipyridindiy)-tailed TAML" *J. Coord. Chem.* **2014**, 67, 3909-3919.

GLOSARIO

TAML = ligante tetraamido macrocíclico

bpy = 2,2'-bipiridina

phen = 1,10-fenantrolina

DMBA = *N,N'*-dimetilbencilamina

DMAP = *N,N'*-dimetilaminopiridina

phenNH₂ = 5,6-diamin-1,10-fenantrolina

bpyCO₂H = 3,3'-dicarboxi-2,2'-bipiridina

phenCO = 1,10-fenantrolin-5,6-diona

Hphpy = 2-fenilpiridina

GO = glucosa oxidasa

HRP = peroxidasa de rábano

FAD = flavin adenin dinucleotido

GO_{ox} = GO-FAD = glucosa oxidasa en forma oxidada

GO_{red} = GO-FADH₂ = glucosa oxidasa en forma reducida

K_m = constante de Michaelis Menten

V₀ = Velocidad inicial

V_{max} = velocidad máxima

K_i = constante de inhibición

OM = orbital molecular

PAC = complejo polaniónico

A.O. = adición oxidativa

E.R. = eliminación reductora

S.E. = sustitución electrofílica

ROMP = polimerización metatésica por apertura de anillo

ATRP = polimerización radicalica por transferencia de átomo

ABSTRACT

Cyclometalated ruthenium(II) complexes with polypyridine ligands, can rapidly exchange electrons with active sites of redox enzymes such as glucose oxidase (GO) and horseradish peroxidase (HRP). For this reason, these species have been studied as mediators with potential applications in amperometric biosensors, in which the analyte concentration is evaluated through an electric current generated by the redox reaction catalyzed by the enzyme. In other hand, iron-tetraamido macrocyclic ligand (Fe-TAML) complexes which contain 4 amide groups forming a central cavity are catalysts with similar function as HRP active site. These complexes have been tested in conjunction with cyclometalated ruthenium(II) complexes in peroxide quantification with possible use in amperometric sensor.

In this work, we are presenting the synthesis and characterization of a modified TAML, bearing a bipyridine fragment, labeled bpyTAML. The amides can be deprotonated and bounded a transition metal of the first row, forming M-TAML complexes, which have a chelate in the external section for the coordination of cyclometalated ruthenium complex moiety. The main purpose of this structure is to have both metallic complexes in one molecule. Compounds $\text{Li}[\text{Co}^{\text{III}}\text{-bpyTAML}]$ y $\text{Li}_2[\text{Ni}^{\text{II}}\text{-bpyTAML}]$ were obtained, but the instability of the ligand during the metalation process prevented the complex formation using others metals.

Ruthenium complexes were designed and synthetic routes were proposed in order to form bimetallic complex from bpyTAML and M-bpyTAML. However, due to spatial conformation of bpyTAML, the bipyridine fragment could not accomplish its function as bidentate chelate and it was impossible to coordinate ruthenium complexes.

Unstable cycles combined with the spatial configuration of the new M-TAML complexes promote the hydrolysis of the amide groups. From this fragment we could identify new Cu^{II} , Co^{III} and Ni^{II} complexes in which the ligand is a dianion species with 2 $\sigma\text{-N-M}$ bonds and 2 coordinative bonds with amines produced during hydrolysis. Ni and Cu complexes are square planar species, while in the Co complex the metal was oxidized to Co^{III} and acquired an octahedral structure with an hydroxyl group and a water molecule in axial positions. These complexes were later synthesized by an alternative route and were fully characterized.

In this work, we also present a study of the ruthenium complexes effect in glucose oxidation by GO. Kinetic parameters were evaluated recording O_2 concentration with a Clark electrode and, we found that Ru^{II} complexes have an inhibition effect in the enzymatic reaction, similar values for k_i 's and K_M were obtained and, a relationship between the type of inhibition and the electronic properties of the metal was observed. On

the other hand Ru^{III} complexes were activators of the reaction and a no monotonic effect was noted.

RESUMEN

Los complejos ciclometalados de rutenio(II) con ligantes polipiridínicos, pueden llevar a cabo el intercambio de electrones con los sitios activos de enzimas redox, tales como glucosa oxidasa (GO) y peroxidasa de rábano (HRP). Debido a esta propiedad han sido estudiados como mediadores con posible aplicación en biosensores amperométricos, en los cuales la concentración de analito es evaluada a través de una corriente que se genera por la reacción redox catalizada por la enzima. Por su parte los complejos hierro-ligante tetraamidomacrocíclicos (Fe-TAML) son catalizadores que funcionan de manera similar al sitio activo de la HRP; estos complejos han sido probados, conjuntamente con complejos de rutenio para la cuantificación de peróxido, con aplicación como sensores amperométricos.

En este trabajo, se llevó a cabo la síntesis y caracterización de un TAML modificado con un fragmento de bipyridina, denominado bpyTAML, el cual contiene un esqueleto con 4 grupos amidas en una cavidad central que se pueden desprotonar para enlazar un metal de la primera serie de transición formando M-TAML, y cuenta con un quelato en la parte exterior para coordinarse a un complejo ciclometalado de rutenio, con objeto de tener ambos complejos metálicos en una molécula. Fue posible obtener los complejos $\text{Li}[\text{Co}^{\text{III}}\text{-bpyTAML}]$ y $\text{Li}_2[\text{Ni}^{\text{II}}\text{-bpyTAML}]$. Sin embargo, la baja estabilidad del ligante al ser metalado impidió la formación de complejos con otros metales en la cavidad central, principalmente Fe.

Se diseñaron complejos de rutenio y se plantearon rutas sintéticas para formar el complejo bimetalico a partir del bpyTAML y los M-bpyTAML sintetizados, pero debido a la conformación espacial que adquieren las especies bpyTAML, el fragmento de bipyridina no pudo cumplir su función como quelato bidentado, por lo que no fue posible coordinarlo a los complejos de rutenio.

La formación de ciclos inestables y la configuración espacial de los complejos con el nuevo ligante, promueve la fragmentación de los grupos amido de la estructura por hidrólisis de los mismos. A partir de esta ruptura, se pudieron identificar algunos fragmentos entre los que se encontraron complejos metálicos con Cu^{II} , Co^{III} y Ni^{II} , donde el ligante es un dianion con 2 enlaces $\sigma\text{-N-M}$ en los *N*-amídicos y forma 2 enlaces de coordinación con 2 aminas producidas al separarse el fragmento de bipyridina del bpyTAML. Los complejos de Ni y Cu tienen una estructura cuadrado plana, mientras que en el complejo de Co, el metal se oxidó a Co^{III} adquiriendo una geometría octaédrica con un grupo hidroxilo y una molécula de agua en las posiciones axiales. Los complejos fueron sintetizados posteriormente por una ruta alterna, lo que permitió su caracterización por diversas técnicas espectroscópicas.

También se presenta un estudio del efecto de una serie de complejos de Ru^{II} y Ru^{III} sobre la reacción de oxidación de glucosa con GO. Éste se llevó a cabo monitoreando la

concentración de oxígeno con un electrodo de Clark, encontrando que los complejos de Ru^{II} tienen un efecto inhibitorio sobre la reacción enzimática, con valores de $k_i \approx K_M$. Además se observó una relación entre el tipo de inhibición y las propiedades electrónicas sobre el metal. Por otra parte complejos de Ru^{III} fueron activadores de la reacción, observándose un efecto no monotónico en esta interacción.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Complejos de rutenio: características y propiedades	3
2.1.1. Complejos polipiridínicos	4
2.1.2. Ciclimetalación	4
2.1.3. <i>orto</i> -metalación	6
2.1.4. Potencial redox	7
2.1.5. Propiedades luminiscentes	8
2.1.6. Catálisis	9
2.1.7. Anticancerígenos	13
2.1.8. Mediadores de rutenio	14
2.2. Enzimas	15
2.2.1. Estructura y catálisis	15
2.2.2. Cinética enzimática	17
2.2.3. Inhibición y activación enzimática	19
2.2.4. Glucosa oxidasa	23
2.2.5. Biosensor amperométrico de glucosa	24
2.2.6. Mediadores de rutenio para la glucosa oxidasa	26
2.2.7. Peroxidasa de rábano HRP	27
2.3. Metal-TAML (<i>ligante tetraamido macrocíclico</i>)	29
2.3.1. Diseño del M-TAML	30
2.3.2. Complejos polianiónicos PAC	31
2.3.3. Estructura de TAML	32
2.3.4. Metalación del TAML	35
2.3.5. M-TAML como catalizador	36
2.3.6. Actividad tipo peroxidasa	36
2.3.7. Actividad tipo catalasa	37
2.3.8. Catálisis del Co-TAML	39
2.3.9. Proceso de degradación del M-TAML	40
2.3.10. Degradación por hidrólisis ácida y básica	40
2.3.11. Degradación por condiciones oxidativas (autodegradación)	41
2.3.12. M-TAML y complejos de rutenio	41
2.4. Referencias	43
3. Hipótesis	48
4. Objetivos	49
5. Complejos ciclometalados de rutenio	50
5.1. Primer propuesta: complejos con ligantes lábiles	50
5.1.1. Precursor $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Cl}_2]_2$ (1)	51
5.1.2. $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$ (2)	51

5.1.3.	[Ru(phpy)(CH ₃ CN) ₃ (CO)]PF ₆ (3)	52
5.1.4.	<i>cis</i> -[Ru(phpy)(phen)(CH ₃ CN) ₂]PF ₆ (4)	56
5.1.5.	<i>trans</i> -[Ru(phpy)(phen)(CH ₃ CN) ₂]PF ₆ (5)	56
5.2.	Segunda propuesta: complejos conteniendo grupos para ser condensados	57
5.2.1.	Ligantes polipiridínicos con grupos funcionales	57
5.2.2.	Complejo [Ru(phpy)(phen)(penNH ₂)] ⁺	58
5.2.3.	<i>cis</i> -[Ru(phpy)(phenCO)(CH ₃ CN) ₂]PF ₆ (6)	60
5.2.4.	<i>trans</i> -[Ru(phpy)(phen)(phenCO)]PF ₆ (7)	60
5.2.5.	[Ru(phpy)(phen)(bpyCO ₂ H)]PF ₆ (8)	61
5.3.	Parte experimental	62
5.4.	Referencias	68
6.	Ligante TetraAmido MacroCíclico (TAML) modificado	70
6.1.	TAML modificado con fenantrolina (phenTAML)	70
6.2.	TAML modificado en la cola con 2,2-bipiridina (bpyTAML)	75
6.3.	Parte experimental	81
6.4.	Referencias	86
7.	Metalación del bpyTAML y reacciones para ensamblar el ligante al complejo de rutenio	87
7.1.	Metalación del bpyTAML	87
7.1.1.	Metalación con hierro	87
7.1.2.	Metalación con cobre	90
7.1.3.	Metalación con cobalto	91
7.1.4.	Metalación con níquel	93
7.2.	Descomposición de M-bpyTAML y síntesis de complejos M-15	95
7.2.1.	Complejo Cu-15	96
7.2.2.	Complejo Co-15	97
7.2.3.	Complejo Ni-15	99
7.3.	Reacciones para formar el complejo bimetalico	100
7.3.1.	Sistema bimetalico por intercambio de ligantes	101
7.3.2.	Formación del complejo bimetalico por reacción de condensación	104
7.4.	Análisis del bpyTAML y M-bpyTAML mediante cálculos DFT	105
7.5.	Parte experimental	109
7.6.	Referencias	113
8.	Complejos de rutenio como efectores de la glucosa oxidasa	116
8.1.	Síntesis de complejos ciclometalados	116
8.2.	Metodología del estudio cinético	120
8.2.1.	Curva estándar (ausencia de complejos)	120
8.2.2.	Efecto del complejo de coordinación (16)	123
8.2.3.	Efecto de complejos ciclometalados de rutenio(II)	124
8.2.4.	Efecto de complejos de rutenio(III)	128
8.3.	Parte experimental	132

8.4. Referencias	133
9. Conclusiones	136
10. Anexos	A1-A13
11. Publicaciones	

1. Introducción.

El pensamiento científico actualmente se ha enfocado en la idea de que los sistemas biológicos son los modelos más eficientes en términos energéticos, además de ser sistemas sostenibles que no representan riesgos para el medio ambiente. Es por ello que la tendencia de la química está dirigida al entendimiento de estos sistemas y la replicación de sus propiedades y funciones.

Asimismo, en las últimas décadas la química de los metales de transición ha centrado una parte de su atención en los sistemas biológicos, desarrollando un gran número de complejos inspirados en los sitios activos de las enzimas, algunos de los cuales han logrado emular la catálisis enzimática. A pesar de algunas desventajas encontradas en estos complejos (como su menor especificidad), la aplicación de estas especies químicas resulta sumamente atractiva debido a la disminución en el costo de producción con respecto a la obtención de enzimas desde una forma biológica, además facilita la manipulación y permite introducir modificaciones a través de grupos funcionales dentro de las moléculas.

En este ámbito, desde los años 1980's el grupo del Dr. Collins se ha dedicado al diseño y desarrollo de complejos de metales de transición cuya función se asemeja a una peroxidasa. A estos complejos se les denominó M-TAML en donde el metal pertenece a la primera serie de transición: Co, Cr, Ni, Cu y principalmente Fe, lo que le confiere mayor biocompatibilidad. Estos complejos se activan con peróxidos formando especies fuertemente oxidantes capaces de degradar moléculas, por lo que han sido usados por ejemplo, como agentes de tratamiento de aguas residuales, detergentes, residuos de la industria papelería, entre otras cosas. Adicionalmente, estos complejos se fragmentan en pequeñas moléculas "inofensivas", lo que les confiere la característica de amigable al medio ambiente. Una aplicación menos explorada de los M-TAML, es su uso en sensores de peróxido, sustituyendo a las peroxidasas de un biosensor de peróxidos tipo amperométrico. Los M-TAML's pueden reducir el H_2O_2 a H_2O generando una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de H_2O_2 presente.

La influencia de los sistemas biológicos en química organometálica no queda acotada a replicar sitios activos de enzimas, encontramos también moléculas diseñadas para interactuar con estos, ya sea sustituyendo un sustrato en reacciones enzimáticas o bien promoviendo la reacción mediante la transferencia de electrones o de grupos funcionales. Incluso, se han estudiado un gran número de compuestos capaces de bloquear o acelerar las reacciones enzimáticas, los cuales están destinados principalmente a la medicina. Dentro de este contexto, nuestro grupo de trabajo se ha concentrado en la síntesis de diversas especies ciclometaladas de rutenio y osmio, que han mostrado una alta afinidad con los sitios activos de enzimas redox como glucosa oxidasa GO y peroxidasa de rábano HRP, y pueden llevar a cabo reacciones redox con

los sitios activos sustituyendo al cosustrato natural. Asimismo, estos complejos pueden cambiar su estado de oxidación y permanecer estables al interactuar con la corriente generada en un electrodo, por ello sirven como “transportadores de electrones” o mediadores entre la enzima y el electrodo, y se pueden usar en biosensores amperométricos. No obstante, debido a que los complejos pueden interactuar con el sitio activo de la enzima, nuestra tarea incluye estudiar los efectos de nuestros derivados sobre las reacciones enzimáticas, a través de la evaluación de los parámetros cinéticos.

En este proyecto se presenta el diseño de un complejo bimetalico, que en una molécula conjunta, por un lado una estructura de M-TAML para funcionar como peroxidasa, y por otro lado la estructura de un complejo ciclometalado de rutenio, que pueda transportar electrones entre el fragmento M-TAML y un electrodo.

Adicionalmente, se estudiaron los efectos de los complejos de rutenio en la reacción de oxidación de glucosa con glucosa oxidasa, por medio de los parámetros cinéticos obtenidos.

2. Antecedentes

2.1. Complejos de rutenio: características y propiedades

El rutenio es un metal de transición del grupo 8 de la Tabla Periódica. Fue descubierto por Karl Ernst Claus en 1844, es poco abundante y presenta características físicas y químicas que permiten clasificarlo dentro del denominado grupo del platino, que incluye a los elementos Ru, Os, Rh, Ir, Pd y Pt.

Su configuración electrónica es $[\text{Kr}] 4d^7 5s^1$, y una de las características más importantes es la amplia variedad de estados de oxidación que puede presentar, puesto que es uno de los pocos metales capaces de adoptar once estados de oxidación, desde -2 (en el compuesto $[\text{Ru}(\text{CO})_4]^{2-}$) hasta el +8 (en el compuesto RuO_4).¹ Esta gama de estados de oxidación ha permitido la síntesis y aplicación en diferentes ámbitos de un sinnúmero de compuestos de rutenio. Especies como el RuO_4 , el ion perrutenato $[\text{RuO}_4]^-$ y compuestos de Ru^{VI} $[\text{Ru}(\text{OH})_2\text{O}_3]^{2-}$ ó $[\text{RuO}_2\text{Cl}_3]^-$ son oxidantes fuertes, y han sido utilizados principalmente en la oxidación de alcoholes y halogenuros de arilo a ácidos carboxílicos y cetonas en medio básico, permitiendo un mejor control de los productos de oxidación con las especies de Ru^{VI} .

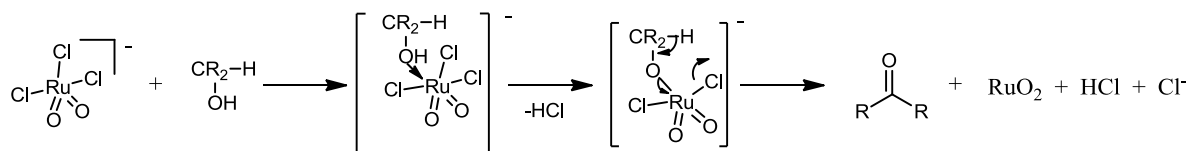


Figura 2.1. Oxidación de alcoholes con el complejo $[\text{Ru}^{\text{VI}}\text{O}_2\text{Cl}_3]^-$

Los rutenuros CeRu_2 son especies muy raras, pero han sido estudiados como superconductores.² Los complejos de rutenio con estados de oxidación +2, +3 y +4 son los más frecuentes y se han descrito una gran diversidad de ellos, así como sus aplicaciones en diversos campos; como óptica,³ sensores moleculares⁴ y magnetismo.⁵ Complejos con ligantes *N*-heterocíclicos son usados como agentes de reconocimiento de ADN en terapias antitumorales.⁶ Algunos de estos complejos se muestran muy prometedores en terapias contra el cáncer.^{7a} Asimismo, complejos con ligantes polipiridínicos son utilizados como sensores en la conversión fotoquímica de la energía solar.⁸

2.1.1. Complejos polipiridínicos

Los ligantes polipiridínicos son ligantes multidentados cuya estructura es a base de anillos de piridina, como el caso de la 2,2'-bipiridina (**bpy**) o 1,10-fenantrolina (**phen**). Los complejos polipiridínicos son compuestos de coordinación, donde el metal se une a este tipo de ligantes frecuentemente formando quelatos. El más conocido y estudiado es el $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ el cual exhibe luminiscencia a temperatura ambiente y en disolución acuosa. Algunos de estos complejos también han sido estudiados en la intercalación con las cadenas de ADN.⁹

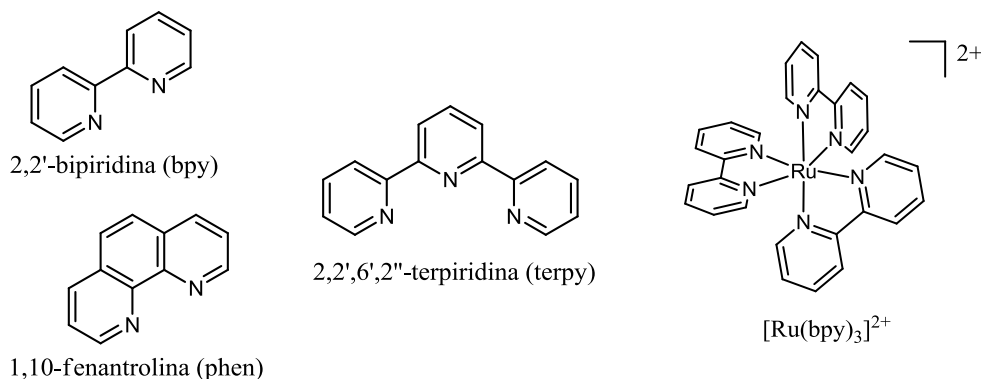
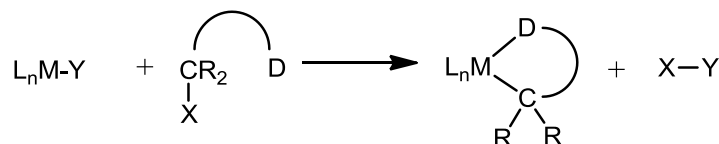


Figura 2.2. Ligantes polipiridínicos y estructura del complejo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$

2.1.2. Ciclometalación

Se llama metalociclo al compuesto cuya estructura contiene un ciclo en el cual al menos uno de sus átomos es un metal. Este metal generalmente se une a un átomo de carbono por un enlace σ y a un átomo donador como N, O, P ó S, por un enlace de coordinación. La ciclometalación es la reacción mediante la cual se forman los metalociclos y se puede llevar a cabo de diferentes formas. Dependiendo del precursor, puede darse por activación directa del enlace C-H, a través de la disociación de un enlace C-X, o bien por transmetalación.¹⁰



X = H: activación directa, X = metal: transmetalación, D = átomo donador

Figura 2.3. Reacción de ciclometalación

A través de estudios cinéticos sobre reacciones de activación directa C-H se han descrito 3 mecanismos diferentes mediante los cuales puede ocurrir la ciclometalación.

A) Adición oxidativa. En este mecanismo el metal actúa como nucleófilo. Para que la reacción se lleve a cabo, el complejo precursor debe contener un orbital molecular (OM) de tipo σ vacío (sobre el cual se formará un enlace M-H) y un par de electrones situado en un OM de alta energía, los cuales serán transferidos al orbital σ^* del C-H. Este mecanismo es apropiado para metales en bajos estados de oxidación y con sitios de coordinación vacantes. En el mecanismo de adición oxidativa, el producto se obtiene a través de un intermediario hidruro (donde el metal aumenta su estado de oxidación y número de coordinación en 2 unidades). Sin embargo, no en todos los casos es posible detectarlo debido a una rápida eliminación reductora en donde se disocia. Esto puede generar confusión al momento de determinar el mecanismo de reacción.

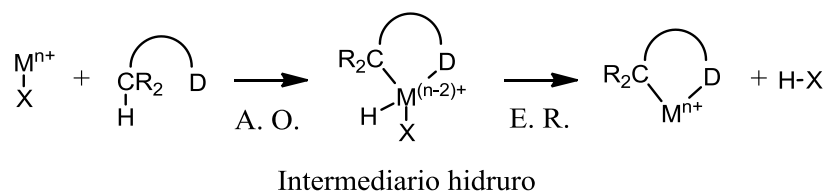


Figura 2.4. Ciclometalación por activación directa C-H mediante adición oxidativa

B) Sustitución electrofílica. El metal actúa como electrófilo. En este mecanismo, el metal central no cambia su estado de oxidación durante la reacción, el H es liberado como H^+ (no se forma el hidruro) y por tal motivo la reacción frecuentemente es asistida por especies nucleofílicas, compuestos de coordinación o bases que pueden neutralizarlo. Resulta muy complicado poder diferenciar entre el mecanismo de adición oxidativa cuando se pierde el hidruro y el mecanismo por sustitución electrofílica. Sin embargo, en el mecanismo de sustitución electrofílica (sobre todo en la ciclometalación sobre anillos aromáticos) se observa que los sustituyentes que aumentan la densidad electrónica sobre el carbono producen mejores rendimientos en la reacción, mientras que con sustituyentes que extraen densidad electrónica del carbono, se producen los rendimientos más bajos.

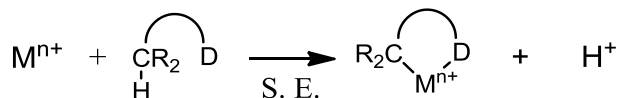


Figura 2.5. Ciclometalación por activación directa C-H mediante sustitución electrofílica.

C) Mecanismo por multicentros. Ocurre de manera similar a una reacción nucleofílica asistida por un electrófilo. En este mecanismo debe existir una base dentro de la estructura del complejo metálico y se requiere que haya un solo OM tipo σ libre. Este orbital permite estabilizar un estado de transición a 4 centros mediante el cual la reacción procede.¹¹

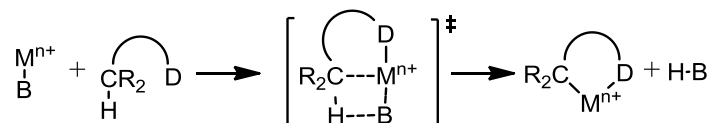


Figura 2.6. Ciclometalación por activación directa C-H con mecanismo por multicentros

2.1.3. *orto*-Metalación

La *orto*-metalación es una ciclometalación que ocurre específicamente cuando se tiene un anillo aromático sustituido con un grupo que contiene un átomo donador. Durante la *orto*-metalación, primero se coordina el átomo donador al centro metálico y después ocurre la formación del enlace M-C sobre el anillo aromático en posición *orto* al grupo donador.¹²

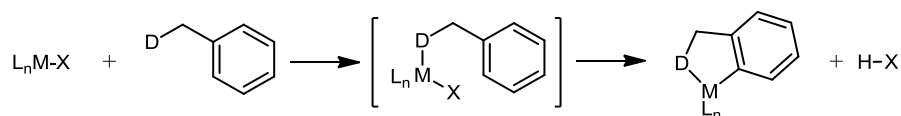


Figura 2.7. *orto*-metalación

La *orto*-metalación fue descubierta entre 1939 y 1940 por los grupos de Gillman y Bebb¹³ y Witting y Fuhrman¹⁴ quienes llevaron a cabo la desprotonación de anisoles con *n*-BuLi. A partir de ese momento, el interés sobre esta reacción creció, debido a la posibilidad de introducir sustituyentes en los grupos aromáticos. Más tarde aparece la *orto*-metalación dirigida por grupos¹⁵ que incluye la técnica de intercambio metal-halogeno.¹⁶

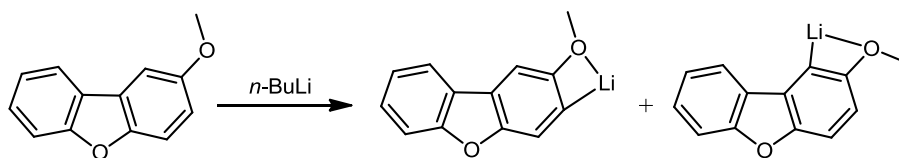


Figura 2.8. Primera reacción de *orto*-metalación.¹³

La *orto*-metalación se realizó principalmente utilizando ligantes bencilaminas y sus derivados, ya que favorecen y estabilizan los productos debido a la formación de un anillo de 5 miembros. En un principio, en estas reacciones se utilizaron Pt y Pd, pero rápidamente

se extendió a los demás metales debido a la facilidad para llevarla a cabo, sobre todo al tratarse de la activación directa. Actualmente, existe una amplia variedad de metalociclos de rutenio.^{17, 18}

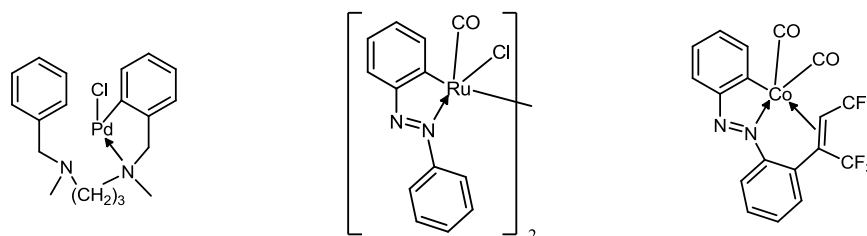


Figura 2.9. Complejos *orto*-metalados.¹⁷

2.1.4. Potencial redox

Los complejos de coordinación con polipiridinas tienen una larga historia y se han estudiado ampliamente diversas de sus propiedades y aplicaciones. En años más recientes han sido sintetizados complejos ciclometalados con estructuras similares a sus pares de coordinación, cuyas propiedades se ven modificadas por la incursión de enlaces C-M, incrementando la investigación en el diseño de complejos con propiedades específicas. Esta tendencia es muy representativa en caso de rutenio y osmio.¹⁷ Entre las diferencias más importantes que produce el enlace organometálico se encuentran: una mayor rigidez en la estructura del complejo y una mayor densidad electrónica sobre el centro metálico, lo que provoca la disminución del potencial redox con respecto a los complejos de coordinación.

Un claro ejemplo de la diferencia del potencial redox en especies ciclometaladas se observa en la serie de complejos de osmio: $[\text{Os}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (**A**), $[\text{Os}^{\text{II}}(\text{phpy})(\text{bpy})_2]^+$ (**B**), $[\text{Os}^{\text{III}}(\text{phpy})_2(\text{bpy})]^+$ (**C**) y $[\text{Os}^{\text{III}}(\text{phpy})_3]$ (**D**) (bpy = 2,2'-bipiridina y Hphpy = 2-fenilpiridina) en la cual a medida que aumenta el número de enlaces σ -C-M el potencial redox $\text{Os}^{\text{III}}/\text{Os}^{\text{II}}$ va disminuyendo. También cabe destacar que cada enlace C-M aumenta en -1 la carga formal del complejo, (debido al bajo potencial redox de los complejos **C** y **D** las especies más estables se encuentran como Os^{III}). Se ha encontrado un comportamiento similar para la misma serie de complejos con rutenio, sin embargo, no se ha podido sintetizar el complejo $\text{Ru}(\text{phpy})_3$ (la serie de rutenio se presenta en el capítulo 8).¹⁹

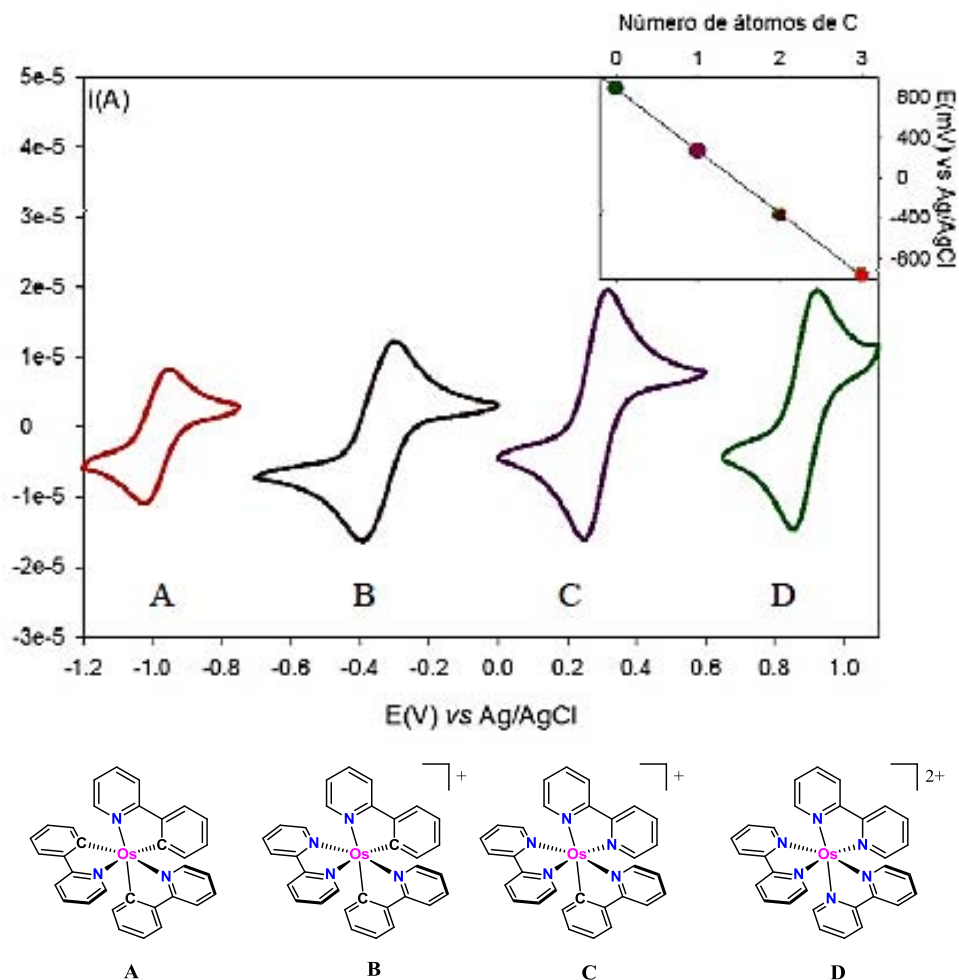


Figura 2.10. Voltamperometría cíclica de la serie de complejos de Os de 0 a 3 enlaces σ -C-Os en la esfera de coordinación. $[Os] = 1 \text{ mM}$ en CH_3CN , $\text{N}(n\text{-Bu})_4\text{PF}_6 = 0.01 \text{ M}$, velocidad de barrido de 100 mV/s . Tendencia lineal del potencial vs número de carbonos (grafica insertada en la parte superior) y estructura de los complejos (inferior).¹⁹

2.1.5. Propiedades luminiscentes

De la misma manera se han sintetizado complejos de coordinación de rutenio y sus pares ciclometalados para estudiar las variaciones en sus propiedades luminiscentes. Ejemplo de ello es la comparación entre los complejos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppn})]^{2+}$ de coordinación y su par ciclometalado $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{phpy})(\text{dppn})]^+$ (dppn = benzo[i]dipirido[3,2-a-2',3'-c]fenacina) en donde se puede observar que el complejo ciclometalado absorbe a una mayor longitud de onda que el complejo de coordinación, debido a la diferencia energética existente entre los OM de ambos compuestos.²⁰

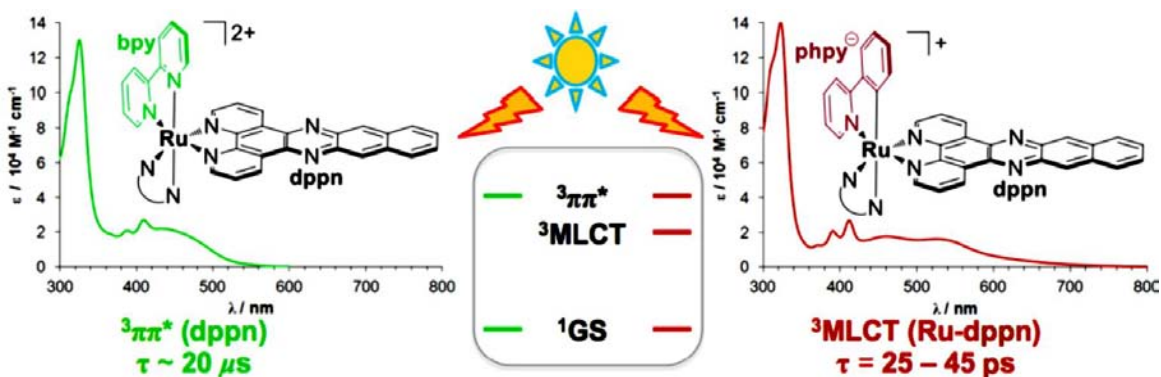


Figura 2.11. Espectros de UV-Vis, estructura y diagrama de orbitales frontera de los complejos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppn})]^{2+}$ (izquierda) y $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{phpy})(\text{dppn})]^+$ (derecha).²⁰

2.1.6. Catálisis

Existen muchos casos de reacciones que son catalizadas por complejos de rutenio, en las cuales el catalizador no es una especie ciclometalada. Sin embargo, el ciclo catalítico se lleva a cabo a través de intermediarios ciclometalados, esto resulta común en reacciones de acoplamiento C-C.

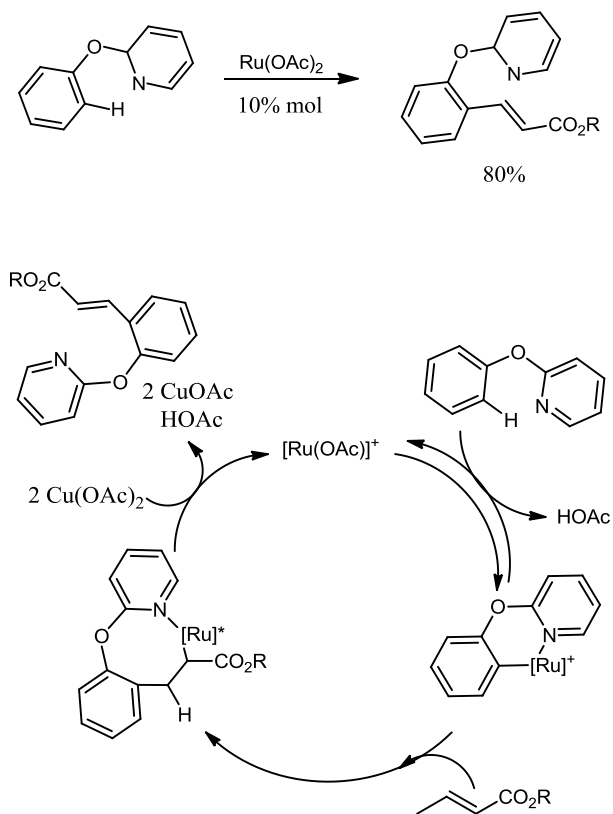


Figura 2.12. Ciclo catalítico alqueniación de aromáticos catalizada con complejos de rutenio^{21a}

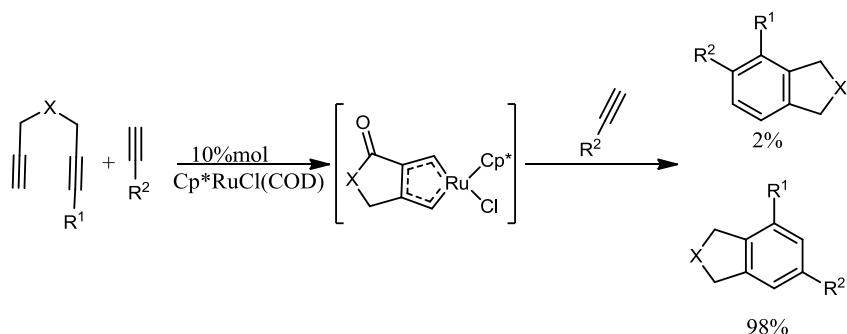


Figura 2.13. Cicloadición de dienos con alquinos terminales catalizada con rutenacilos.^{21b}

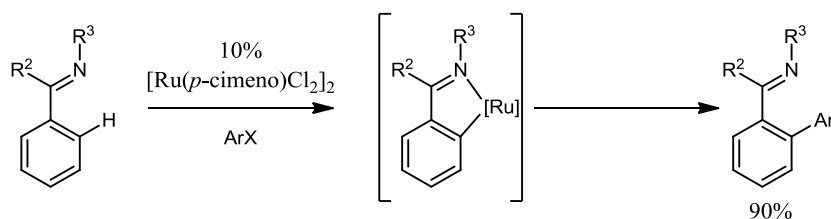


Figura 2.14. Arilación de arenos catalizada por rutenacilos.^{21c}

Las especies ciclometaladas de rutenio también han podido ser aplicadas como catalizadores. Por ejemplo, complejos tipo pinza NCN y PCP y “piano stool” de Ru^{II} , catalizan la transferencia de hidrógeno entre alcoholes y cetonas.^{22, 23}

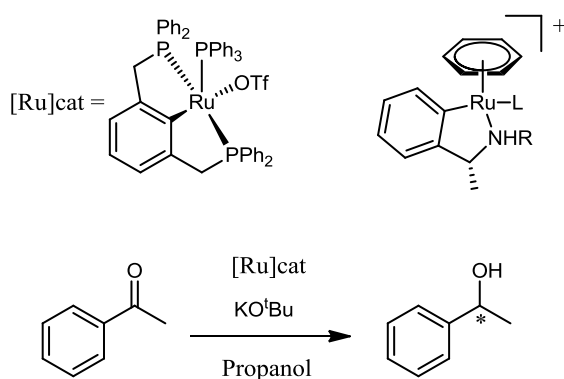


Figura 2.15. Transferencia de H entre alcoholes y cetonas catalizada por rutenacilos.

En los ejemplos anteriores, el metalociclo confiere estabilidad a los complejos. Además, contienen ligantes que pueden descoordinarse dejando un sitio vacante, en el cual se forman hidruros a partir de una fuente de hidrógeno. Las especies catalíticas son capaces de transferir el H a la cetona.

Otro ejemplo donde el catalizador es una especie ciclometalada de rutenio, se encuentra en reacciones de acoplamiento C-C.²⁴

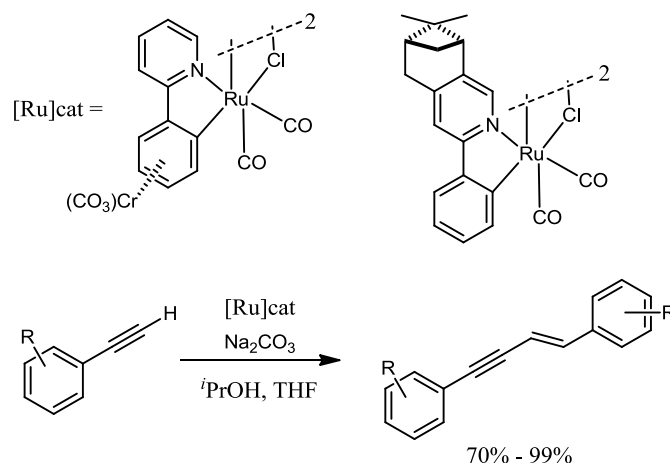


Figura 2.16.- Acoplamiento C-C catalizado por rutenacilos.

El avance en la investigación de complejos ciclometalados de rutenio ha permitido llegar a tener control sobre la catálisis. Por ejemplo, en reacciones de fotopolimerización, en donde se aprovecha la propiedad de ciertos complejos de hacer una fotoisomerización. Como informa el grupo del Dr. Takana,²⁵ el complejo $[Ru(tpy)(PAD)(OH_2)]^+$ al ser irradiado con luz, los ligandos sufren un reacomodo debido a que la energía absorbida por el complejo promueve la descoordinación de un ligante, generando un sitio vacante y permitiendo así la reorganización de los mismos.

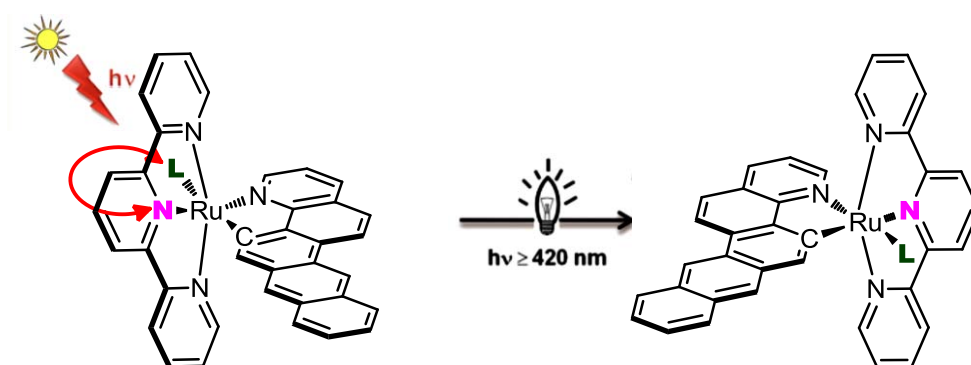


Figura 2.17. Fotoisomerización del complejo $[Ru(tpy)(PAD)(OH_2)]^+$. (PAD = 2-(pirid-2'-il)acridina).²⁵

Al combinar la fotoisomerización con las propiedades como catalizadores de polimerización se ha podido controlar la catálisis mediante la irradiación de luz.

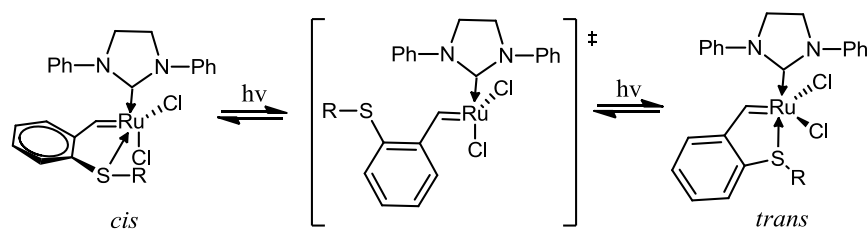


Figura 2.18. Fotoisomerización del catalizador de Grubbs de 2ª generación.²⁶

En la reacción anterior podemos observar que en el catalizador de Grubbs de 2ª generación, se promueve la isomerización del complejo *cis* al complejo *trans* cuando es irradiado. En su forma *trans* el complejo funciona como catalizador de polimerización ROMP.²⁶

Monomero	Z/E	% conversión
	1.7	66
	3.1	>99
	1.1	84

Tabla 2.1. Conversión por fotopolimerización ROMP del complejo

En un ejemplo similar, cuando el complejo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{phen})(\text{CH}_3\text{CN})_2]^+$ es irradiado, se activa la polimerización ATRP de olefinas.²⁷ Recientemente, se encontró que esta especie se isomeriza al complejo $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{phen})(\text{CH}_3\text{CN})_2]^+$ con irradiación de luz UV, por lo que se piensa que la polimerización puede estar mediada por la especie *trans*.²⁸

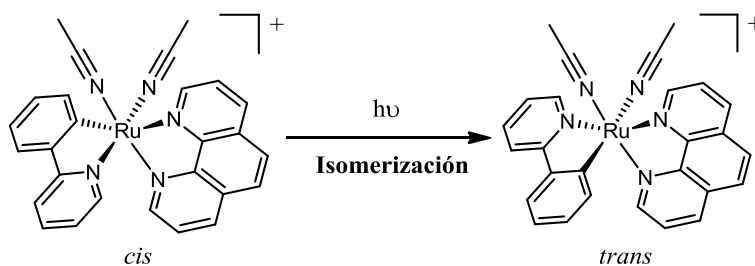
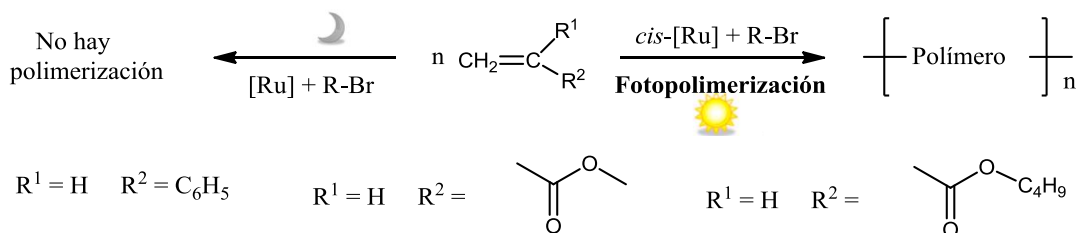


Figura 2.19. Fotopolimerización de olefinas catalizada por el $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{phen})(\text{CH}_3\text{CN})_2]^+$ (superior) y la fotoisomerización *cis-trans* del complejo (inferior).

2.1.7. Anticancerígenos

En años recientes, la búsqueda de nuevos compuestos anticancerígenos ha permeado en el campo de los complejos organometálicos. El grupo del Dr. Gaiddon se ha enfocado en la investigación de rutenaciclos como agentes anticancerígenos, encontrando mejores resultados en algunos complejos que los utilizados actualmente con platino. A través de estos estudios se tiene evidencia de que el mecanismo de acción de los rutenaciclos no es por intercalación, como ocurre con el *cis*-platino. Además, en otros complejos utilizados como medicamentos, usualmente se descoordinan los ligandos o se fragmentan los complejos antes de llegar al sitio donde deben realizar su acción. Sin embargo, con los estudios realizados en complejos ciclometalados de rutenio, se ha encontrado que mantienen su estructura hasta llegar al sitio de acción. Se cree que actúan a través de la interacción con enzimas, modificando las propiedades redox de los sistemas y evitan la producción de especies reactivas de oxígeno que producen muerte celular. De esta manera, se explica también el porque no se desarrolla tanta resistencia. Al utilizar el complejo *cis*-[Ru(phpy)(phen)(CH₃CN)₂]PF₆ se encontró una reducción del 40% en el crecimiento de células cancerígenas en ratones, efecto análogo al obtenido con *cis*-platino. Además, el complejo de rutenio resultó tener una toxicidad crónica mucho menor.^{7, 29, 30}

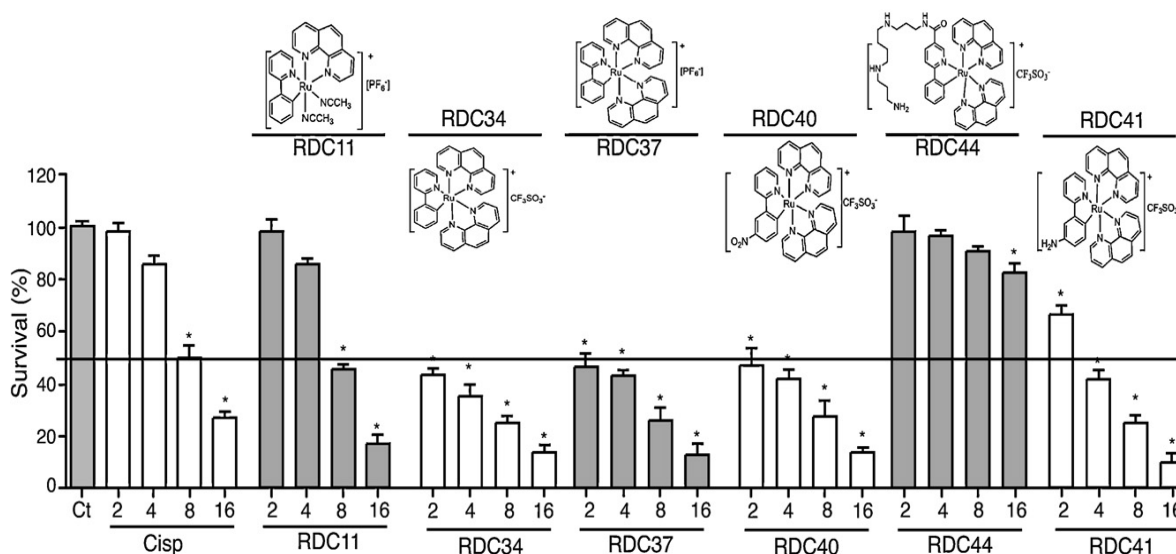
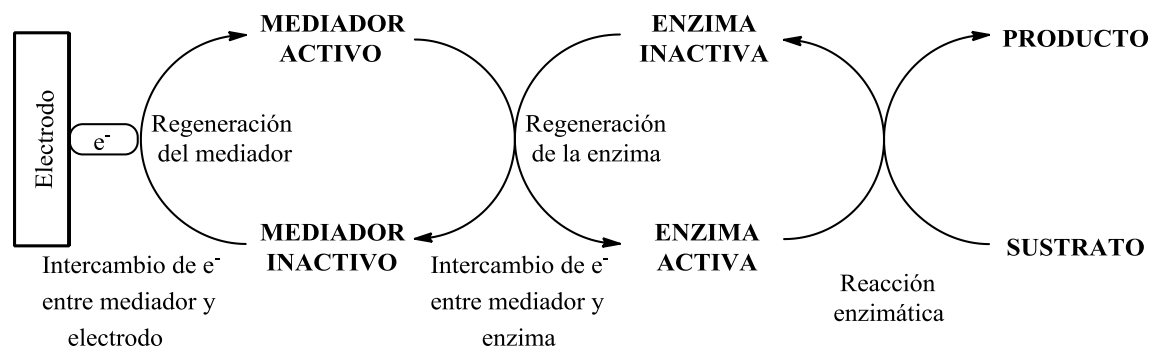


Figura 2.20. Grafica de supervivencia de células cancerígenas de colon humano en diferentes concentraciones de los complejos ciclometalados de rutenio (Ct = control, Cisp = *cis*-platino).⁷

2.1.8. Mediadores de rutenio

Una de las aplicaciones más importantes encontradas recientemente para los complejos ciclometalados de rutenio, es su capacidad de funcionar como mediadores de electrones con enzimas redox.³¹⁻³³

Los mediadores son moléculas que tienen la capacidad de intercambiar electrones entre el sitio activo de la enzima y un electrodo. Para que sea un buen mediador, el complejo organometálico debe tener un potencial redox adecuado. Su comportamiento redox debe ser reversible y ser estable tanto en su estado oxidado como en el reducido. El tamaño también es importante ya que debe interactuar con el sitio activo de la enzima, debe tener un comportamiento independiente del pH y reaccionar rápidamente con el sitio activo de la enzima.

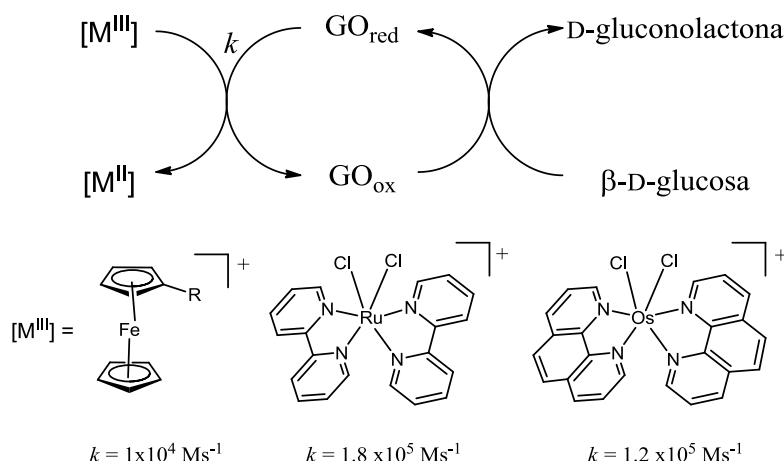


Esquema 2.1. Funcionamiento del mediador redox con la enzima

En el esquema anterior la “enzima activa” se refiere a la forma de la enzima en la cual reacciona con el sustrato, mientras que el “mediador activo” es la forma en la cual el mediador puede transferir electrones a la enzima. El estado de oxidación de las especies y el flujo de los electrones dependerá de si la reacción enzimática es una oxidación o es una reducción.

Los primeros mediadores estudiados fueron derivados del ferroceno, después se observó la transferencia de electrones entre complejos polipiridínicos de Ru^{III} y Os^{III} que eran reducidos por la GO a Ru^{II} y Os^{II} , en presencia de glucosa. Fue posible medir la constante de velocidad de transferencia de electrones entre los compuestos y la enzima, obteniéndose una constante de velocidad (k) mayor a la de los ferrocenos. Esto debido a una menor interacción entre los complejos y el sitio activo de la enzima. Es decir, que los complejos de

Ru y Os se reducen en el sitio activo y por su baja afinidad hacia la enzima, salen rápidamente de éste dejando el canal libre para que el sistema biológico lleve a cabo la oxidación de la glucosa. Mientras que los ferrocenos permanecen más tiempo dentro del sitio activo y lo bloquean disminuyendo la velocidad de la reacción.³⁴



Esquema 2.2. Intercambio de electrones entre la GO y los complejos polipiridínicos (superior), y estructura de los mediadores de Fe, Ru y Os (inferior).

Más tarde se demostró que los complejos ciclometalados de rutenio funcionan también como mediadores con glucosa oxidasa, peroxidasa de rábano y alcohol deshidrogenasa (ver secciones 2.2.5 a 2.2.7).

2.2. Enzimas

Las enzimas son proteínas especializadas que funcionan como catalizadores de reacciones biológicas. Estos sistemas tienen un poder catalítico extraordinariamente alto y una gran especificidad hacia su sustrato, comparado con los catalizadores inorgánicos. Usualmente, las enzimas aceleran las reacciones químicas y funcionan bajo ciertas condiciones de pH y temperatura.

2.2.1. Estructura y catálisis

Muchas enzimas requieren para su funcionamiento iones metálicos (Fe, Co, Mg, Zn) llamados cofactores o bien moléculas orgánicas ($FAD/FADH_2$) o metal-orgánicas (grupo hemo) llamadas coenzimas. A la parte proteica se le denomina apoenzima, si el cofactor se une fuertemente a la apoenzima, se llama grupo prostético y el conjunto de ellos se conoce

como holoenzima. La parte de la enzima en la cual se une el sustrato y se lleva a cabo la reacción se le llama sitio activo.³⁵⁻³⁷

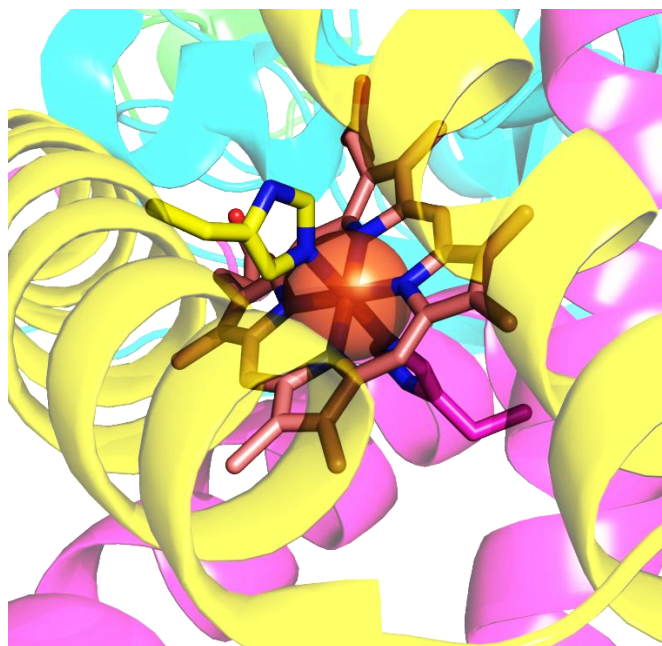


Figura 2.21. Sitio activo de la succinato deshidrogenasa que muestra el grupo prostético (grupo hemo).

Imagen obtenida de Protein Data Bank 1YQ3.

Las enzimas se clasifican según su función en 6 tipos:

Oxidorreductasas	transferencia de electrones
Transferasas	transferencia de grupos
Hidrolasas	reacciones de hidrólisis
Liasas	formación de dobles enlaces
Ligasas	reacciones de condensación
Isomerasas	reacciones de isomerización

Tabla 2.2. Clasificación de enzimas

Las enzimas como cualquier catalizador no modifican la constante de equilibrio (K_{eq}) de la reacción, pero si modifican la velocidad de la misma. Este es el resultado de llevar a cabo la reacción mediante mecanismos alternos en los cuales se tiene una energía de activación mucho menor, debido a diversas interacciones entre los sustratos y la enzima. En el siguiente diagrama de coordenada de reacción se observa que la reacción no catalizada tiene una alta energía de activación ($\Delta G^\ddagger$), mientras que la reacción catalizada ocurre a través de intermediarios en donde la energía de activación ($\Delta G_{cat}^\ddagger$) es mucho menor.^{38,39}

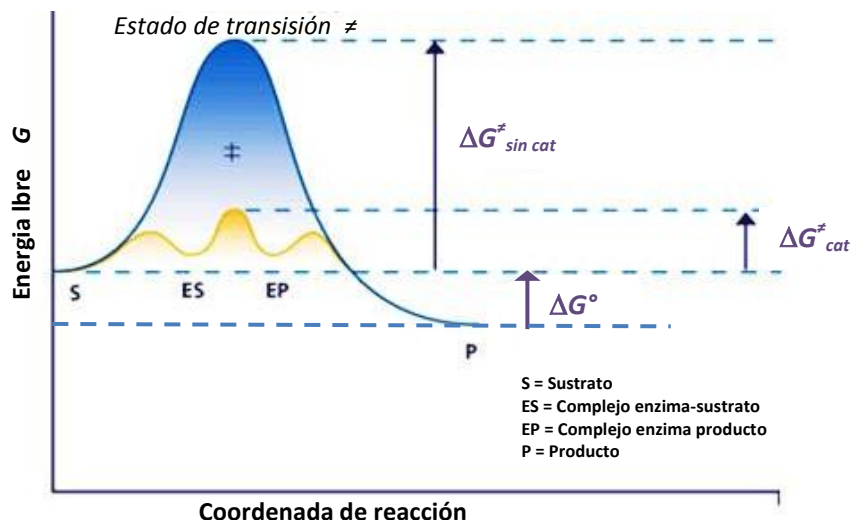


Figura 2.22. Gráfico de coordenada de reacción para una reacción sin catalizar (azul) y su reacción enzimática (amarillo).

Para el estudio de las reacciones enzimáticas se utiliza el modelo de “llave-cerradura” propuesto por Fisher en 1930 que consiste en la formación del complejo enzima-sustrato (ES) a través del cual se obtienen los productos.

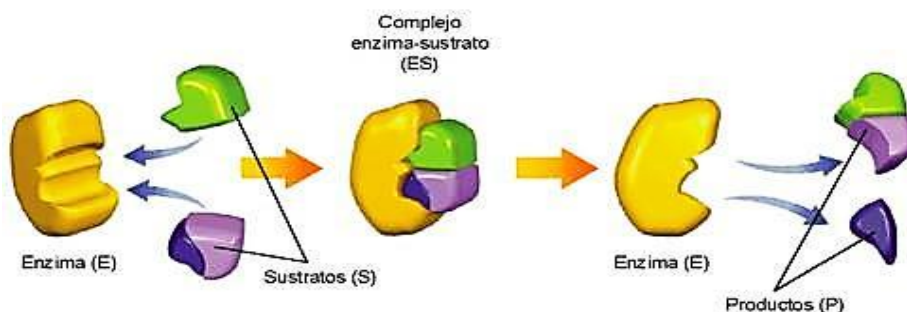


Figura 2.23. Modelo llave-cerradura para una reacción enzimática

2.2.2. Cinética enzimática

La aproximación central para estudiar el mecanismo de una reacción enzimática radica en determinar la velocidad de la reacción en respuesta a las condiciones experimentales. La concentración de sustrato $[S]$ es el principal factor de estudio, sin embargo, resulta muy complicado, debido a que evoluciona durante la reacción, es decir, va disminuyendo y se debe medir el cambio de la concentración en función del tiempo. Para facilitar los estudios se pueden hacer aproximaciones experimentales. La primera es utilizar una concentración de sustrato mucho mayor a la de la enzima (5 ó 6 órdenes de magnitud), otra es hacer las

mediciones durante un periodo corto de tiempo que se conoce como velocidad inicial (V_0). Durante este periodo se considera que la concentración de sustrato permanece constante, así podemos estudiar la dependencia de V_0 en función de $[S]$. El comportamiento típico de una reacción enzimática se representa en el siguiente gráfico.

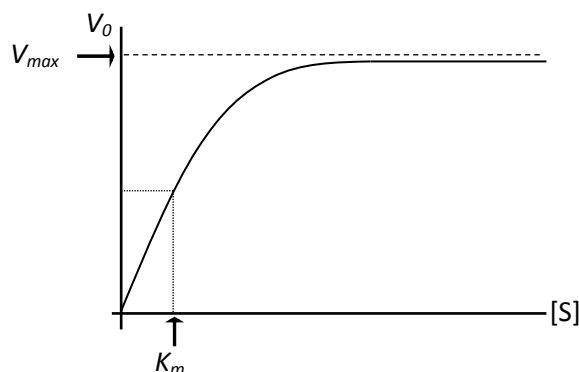


Figura 2.24. Gráfico de Michaelis-Menten que representa el comportamiento de reacciones enzimáticas típicas.

El comportamiento plasmado en la gráfica anterior queda descrito a través de la ecuación de Michaelis–Menten, la cual se obtiene al plantear el siguiente equilibrio:



Donde:

E = enzima, S = sustrato, ES = complejo enzima-sustrato y P = producto

k_x = constante de velocidad

Teniendo que: $V_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]$ (1)

Basados en la aproximación del estado estacionario que implica que la concentración del complejo enzima-sustrato $[ES]$ se mantiene constante:

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

Y usando el balance de masa para la cantidad total de enzima: $[E]_0 = [E] + [ES]$

Encontramos que: $[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2}$

Sustituyendo ahora $[ES]$ en la ecuación 1 llegamos a: $V_0 = \frac{k_2[E]_0k_1[S]}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]}$ (2)

Podemos también definir los parámetros: $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ y $V_{\max} = k_2[E]_0$

Y sustituirlos en (2), entonces obtenemos la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

En la ecuación de Michaelis-Menten aparecen 2 parámetros sumamente importantes:

$V_{\max}$ estima el número de centros activos de la enzima y se define como la velocidad cuando toda la enzima se encuentra unida al sustrato, el valor de este parámetro está dado en Ms^{-1} .

K_m es la constante de Michaelis-Menten, la cual es una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato. Su valor se define como la concentración de sustrato a la cual $V_0 = 1/2 V_{\max}$ y su valor se da en M.

La ecuación de Michaelis-Menten se puede transformar algebraicamente. Una de sus transformaciones más útiles es la de doble recíproco o de Lineweaver-Burk, cuya ecuación es:

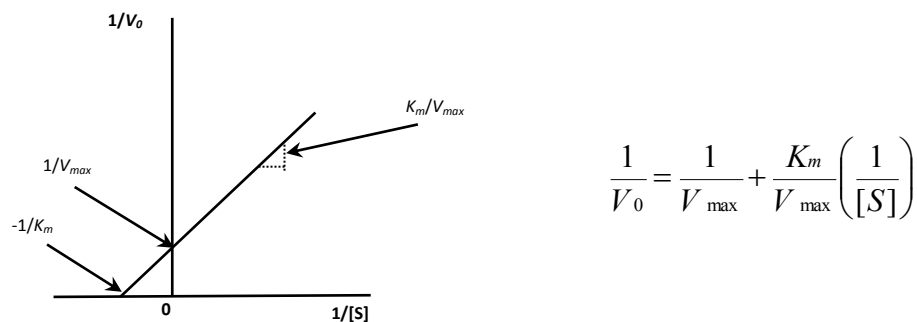


Figura 2.25. Gráfica y ecuación de Lineweaver-Burk

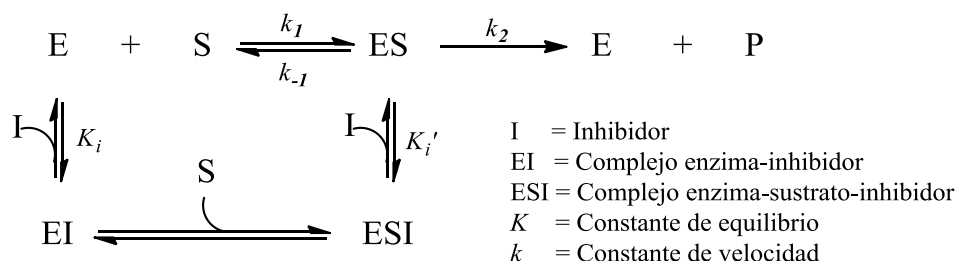
La utilidad de esta ecuación radica en que tiene la forma de una línea recta, donde la pendiente corresponde al valor de $K_m/V_{\max}$, la ordenada al origen es $1/V_{\max}$ y la abscisa al origen es $-1/K_m$ como se observa en la gráfica. Esta forma de la ecuación resulta de particular utilidad para distinguir algunos tipos de mecanismos en cinética enzimática y también para el análisis de inhibición enzimática.⁴⁰

2.2.3. Inhibición y activación enzimática

Los efectores enzimáticos son moléculas que interfieren con la catálisis enzimática. Los que pueden acelerar las reacciones son llamados activadores y existen otras moléculas que

pueden disminuir su velocidad e incluso llegar a detenerla, las cuales se denominan inhibidores enzimáticos. La inhibición puede ser de 2 tipos, reversible o irreversible.

La inhibición reversible ocurre cuando el inhibidor se une a la enzima mediante interacciones débiles y los complejos enzima-inhibidor (EI) se pueden disociar, y se basa en el siguiente esquema de equilibrios:

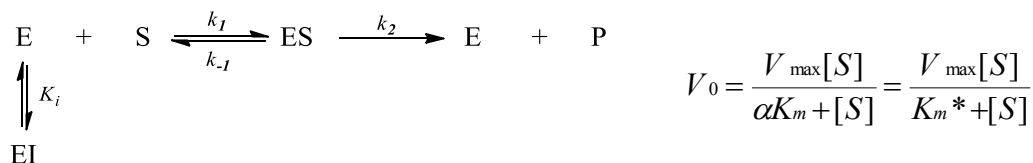


Podemos obtener una ecuación de Michaelis-Menten modificada donde aparecen los factores α y α' que son definidos a través de la concentración de inhibidor [I] y las constantes de disociación de los complejos EI y ESI.

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]} = \frac{(1/\alpha')V_{\max}[S]}{(\alpha/\alpha')K_m + [S]} \quad \text{Donde: } \alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i} \quad \text{y} \quad \alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_i'}$$

A partir de estas ecuaciones se pueden distinguir 4 mecanismos de inhibición reversible.

- 1) Inhibición competitiva. El inhibidor se une a la enzima (usualmente cerca del sitio activo) formando el complejo EI y evita la unión de S. En este caso $\alpha' = 1$ debido a que el equilibrio de K_i' no está presente en la reacción



En este mecanismo conforme aumenta [I], el valor de $V_{\max}$ se mantiene constante mientras que el valor de K_m^* aumenta. Al construir el gráfico de Lineweaver-Burk se observa que las rectas se intersectan en la ordenada al origen.

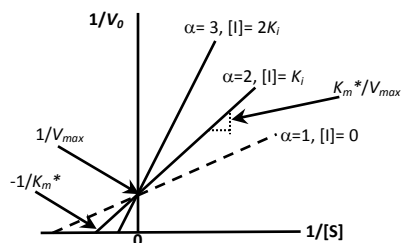
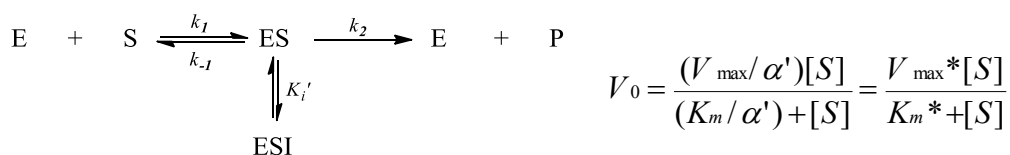


Figura 2.26. Gráfica de Lineweaver-Burk para inhibición competitiva

- 2) Inhibición anticompetitiva. El inhibidor se une únicamente al complejo ES formando el complejo ESI en el cual no se lleva a cabo la catálisis, el equilibrio de K_i no se presenta, por lo que $\alpha = 1$



En este caso, al aumentar $[I]$ el valor de $V_{\max}^*$ disminuye, así como también el valor de K_m^* , pero la relación $K_m/V_{\max}$ permanece constante. En el gráfico de Lineweaver-Burk se observan líneas rectas paralelas.

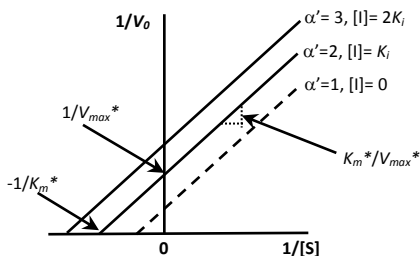
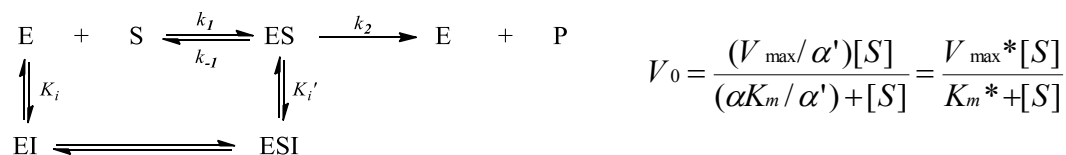


Figura 2.27. Gráfica de Lineweaver-Burk para inhibición anticompetitiva

- 3) Inhibición mixta. Esta inhibición corresponde al esquema inicial donde el inhibidor se une a la enzima y también al complejo ES, se forman las especies EI y ESI que no son catalíticamente activas



Conforme aumenta $[I]$, el valor de K_m^* aumenta, mientras el valor de V_{max}^* disminuye. En el gráfico de Lineweaver-Burk se observa que las rectas intersectan en un punto del segundo cuadrante del plano cartesiano.

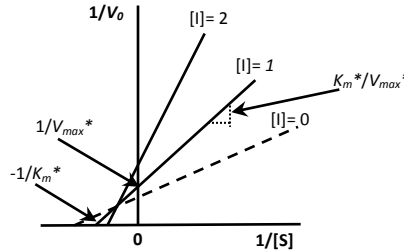
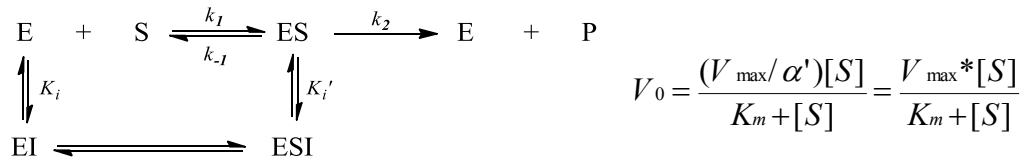


Figura 2.28. Gráfica de Lineweaver-Burk para inhibición mixta

- 4) Inhibición no competitiva. Es un tipo específico de inhibición mixta, donde el inhibidor se une tanto a la enzima libre como al complejo ES, formando las especies EI y ESI que son catalíticamente inactivas, en este caso $\alpha = \alpha'$



Al aumentar $[I]$ el valor de K_m es constante mientras que el de V_{max} disminuye, en la gráfica de Lineweaver-Burk las rectas se intersectan en la abscisa al origen.⁴¹

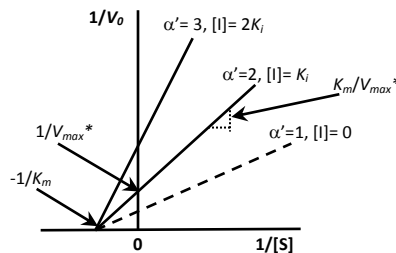
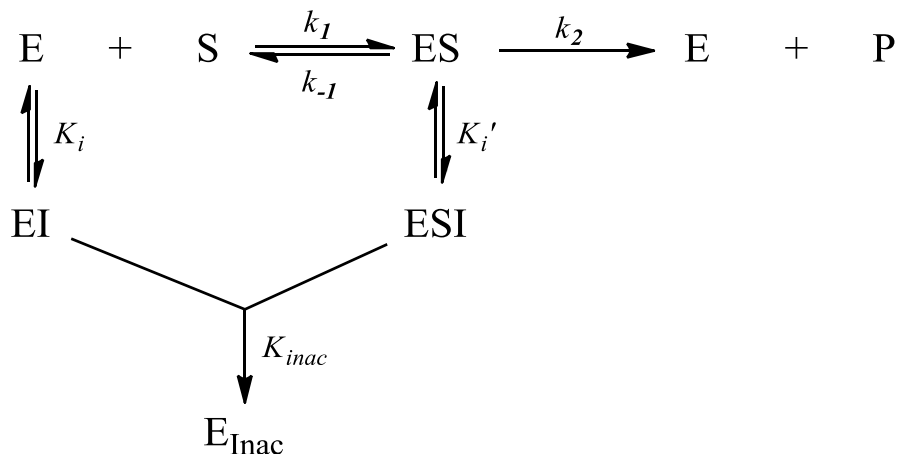


Figura 2.29. Gráfica de Lineweaver-Burk para inhibición no competitiva

La inhibición irreversible funciona de diferente manera, ya que los inhibidores son sustancias que se unen a la enzima o al complejo ES y forman enlaces covalentes que modifican la estructura de la enzima provocando la pérdida de la actividad catalítica. Este tipo de inhibición es dependiente del tiempo y para su estudio se utiliza el parámetro $K_{obs}/[I]$ que se obtiene a través de gráficos de actividad en función de tiempo a diferentes valores de $[I]$.⁴²⁻⁴⁴

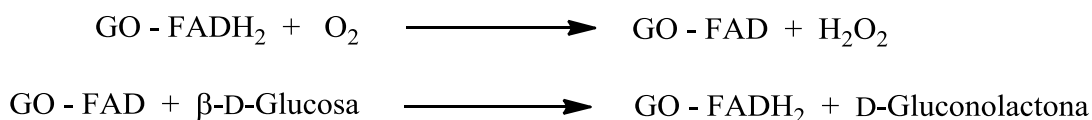


Esquema 2.3. Inhibición enzimática irreversible.

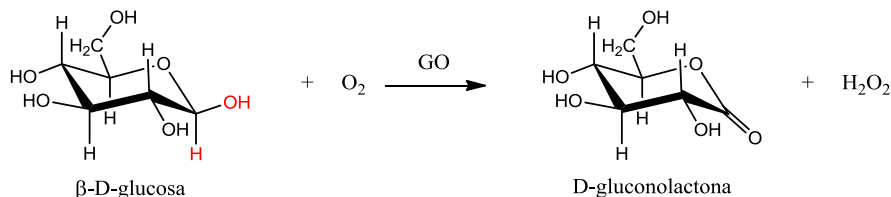
Por otra parte, la activación enzimática ha sido mucho menos estudiada en comparación con la inhibición. En el caso más simple se puede aplicar el mismo mecanismo y ecuaciones descritas para la inhibición no competitiva sustituyendo la $[I]$ por la concentración del activador. En algunos casos se han propuesto mecanismos específicos para cada reacción estudiada.⁴⁵

2.2.4. Glucosa Oxidasa (GO)

La glucosa oxidasa es una oxidorreductasa que cataliza la oxidación de β -D-glucosa, a D-gluconolactona con la reducción de una molécula de O_2 , auxiliada por una molécula de FAD que se encuentra en su sitio activo.



Donde GO-FADH_2 es la forma reducida o inactiva de la enzima GO_{red} y GO-FAD es la forma oxidada o activa de la enzima GO_{ox} , la reacción general se presenta como:



Esta enzima se extrae de varias fuentes, la más común es el hongo *Aspergillus niger*. Entre sus características principales tenemos que: se desnaturaliza alrededor de los 50 °C y es estable en un rango de pH de 5-8, teniendo su mayor actividad a 37 °C y pH = 5. Es una enzima libre de metales cuya estructura consta de 2 subunidades, cada una con un sitio activo. Tiene un peso de 160 kDa y utiliza en su grupo prostético una molécula de flavin adenin dinucleótido (FAD), la cual se encuentra unida de manera covalente. El sitio activo se encuentra a una profundidad de 13-18 Å y contiene una cavidad de 10 Å de diámetro que conduce al mismo.

Debido a la reacción que lleva a cabo, la glucosa oxidasa ha sido empleada en diversas aplicaciones industriales. Es utilizada en la fabricación de vinos de bajo contenido alcohólico, ya que disminuye la cantidad de azúcares previo a la fermentación. Se usa en la industria alimentaria como conservador debido a que elimina el oxígeno en productos enlatados. Es adicionada en pastas dentales y en la miel como antimicrobiano ya que produce H_2O_2 . Una de las aplicaciones más importantes de esta enzima es en la cuantificación de glucosa en sangre a través de biosensores amperométricos.⁴⁶

2.2.5. Biosensor amperométrico de glucosa

Un sensor es un dispositivo que puede detectar o medir una propiedad física o química y generar una señal útil. Contiene una entidad biológica en su diseño que generalmente es usada como elemento de reconocimiento, es decir, la entidad biológica es utilizada para reaccionar con una sustancia específica que será medida. En un biosensor amperométrico el transductor que es la parte que convierte la señal recibida, la transforma en información útil de tipo amperométrico. Es decir, una reacción química produce una transferencia de electrones que puede ser medida.

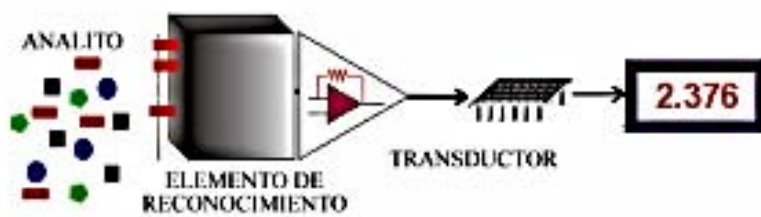
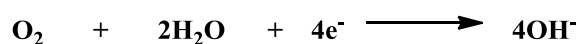


Figura 2.30. Elementos de un biosensor.

Debido a sus características, la glucosa oxidasa es la enzima utilizada como modelo para el estudio de los biosensores amperométricos. Los biosensores de glucosa, inicialmente se basaron en la reacción natural de la GO y su funcionamiento fue a través de la medición de la concentración de O_2 mediante un electrodo de Clark.

El electrodo de Clark contiene una membrana que es selectiva a O_2 , el ánodo es de Ag y el cátodo de un metal noble, usualmente Pt. Estos se unen mediante un electrolito de KCl, así el O_2 difunde hacia los electrodos donde ocurren las siguientes reacciones:

Cátodo (reducción)



Ánodo (oxidación)

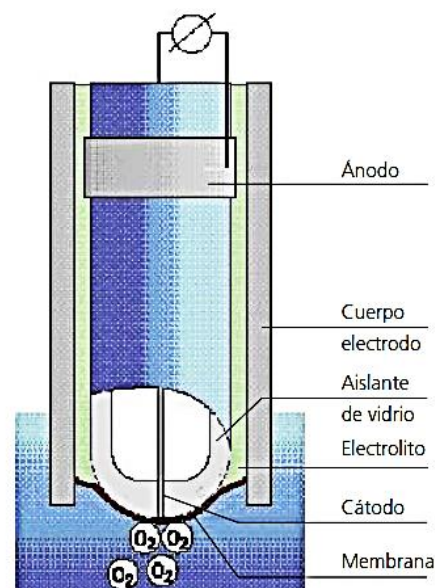
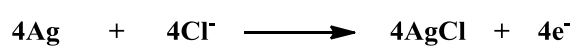


Figura 2.31. Electrodo de Clark

En el electrodo de Clark el sensor es polarográfico y se debe aplicar un voltaje de 0.7 V para llevar a cabo las reacciones que produzcan la corriente y hacer la medición.^{47,48} Sin embargo, estos dispositivos presentaron diversos problemas debido a la formación de peróxidos y la dificultad que existe en la medición de la concentración de un gas, por lo que se hizo una segunda generación de biosensores en la cual el O_2 fue sustituido por mediadores redox. En estos el mediador y la enzima se encuentran en suspensión, la introducción del mediador permitió eliminar las dificultades presentes en los sensores de primera generación. Sin embargo, si la velocidad de intercambio de electrones entre enzima y mediador no es suficientemente rápida existe interferencia con el O_2 por lo que la búsqueda de mejores mediadores sigue siendo un campo de trabajo.⁴⁹ Finalmente, se crearon biosensores de tercera generación en los cuales los componentes se encuentran

soportados directamente sobre el electrodo (adsorbidos o enlazados a un polímero), con este sistema disminuyen las interferencias, pero la afinidad entre el mediador y la enzima puede ser menor por el hecho de estar soportado en el electrodo.^{50,51}

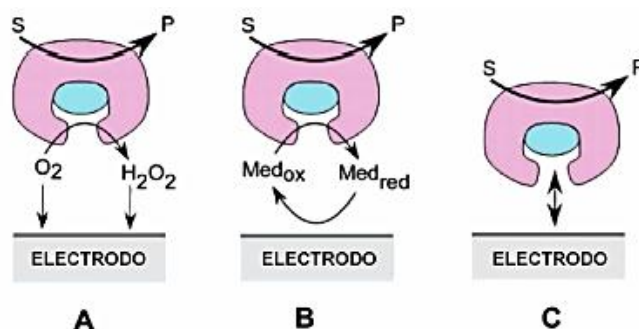
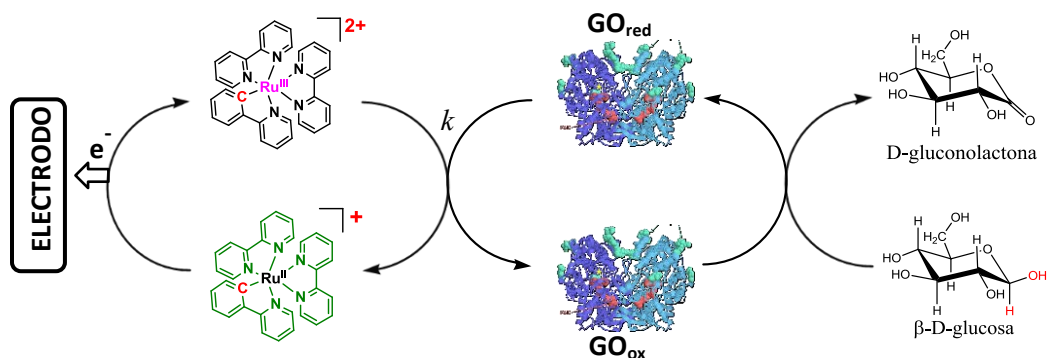


Figura 2.32. Biosensores de glucosa A) 1ª generación (electrodo de Clark), B) 2ª generación (mediadores), C) 3ª generación (sistemas soportados en el electrodo).

2.2.6. Mediadores de rutenio para glucosa oxidasa.

Nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en la síntesis y estudio de complejos ciclometalados de rutenio y osmio como mediadores de enzimas redox, principalmente con la glucosa oxidasa con aplicación a biosensores. En el siguiente diagrama se representa el funcionamiento de dichos sistemas:



Esquema 2.4. Funcionamiento del biosensor amperométrico de glucosa

La β-D-glucosa es oxidada a gluconolactona por la enzima en su forma activa GO_{ox}. Esta reacción produce la forma reducida de la enzima GO_{red}, la cual regenera su forma activa GO_{ox} al llevar a cabo el intercambio de electrones con el complejo de Ru^{III}, produciendo entonces la reducción del complejo a Ru^{II}. Esta especie de rutenio es oxidada de manera electroquímica en la superficie del electrodo regenerando el complejo de Ru^{III} y generando una corriente eléctrica. Se forma un ciclo catalítico hasta que toda la glucosa es oxidada y

en el cual la concentración de β -D-glucosa es evaluada a través de la transferencia de electrones.

Mediante estudios realizados por voltamperometría cíclica y utilizando el método de Bourdillon y Saveant, fue posible obtener la constante de velocidad de intercambio de electrones k entre los diferentes complejos y la enzima.⁵² Cabe destacar que los estudios se realizaron en condiciones libres de O_2 . Entre los complejos de rutenio estudiados encontramos:⁵³

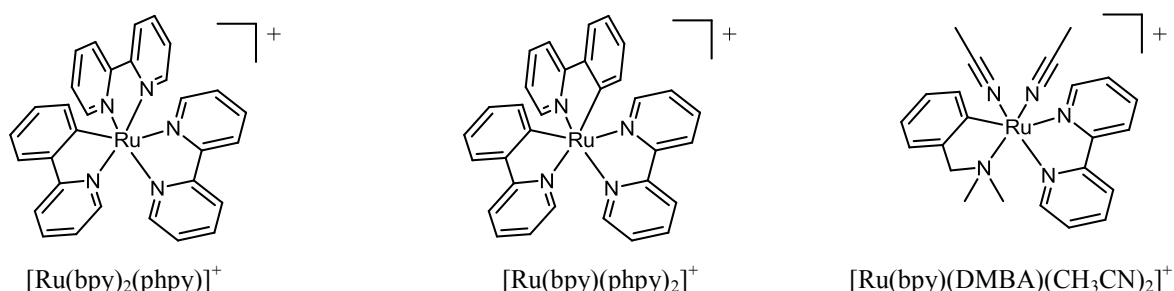


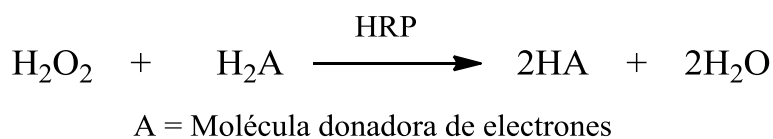
Figura 2.33. Complejos ciclometalados de rutenio utilizados como mediadores de enzimas redox

Los resultados obtenidos con los complejos de rutenio fueron comparados con otros mediadores y se encontró que las constantes de intercambio de electrones son más altas para los complejos de rutenio, llegando a un valor de $k = 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en el complejo $[Ru(phpy)(phen)_2]^+$, que es aproximadamente 1000 veces mayor que los ferrocenos.⁵⁴

2.2.7. Peroxidasa de rábano HRP

La peroxidasa de rábano es una enzima extracelular que se encuentra en las raíces de plantas y existen varias isoformas. La más estudiada es la isoenzima C. Esta enzima cataliza la oxidación de diversos compuestos orgánicos (H_2A) mediante la reducción de H_2O_2 , y actúa en diversas funciones celulares.

La HRP pesa 44 kDa y el sitio activo es un grupo hemo coordinado a la apoenzima por un nitrógeno de imidazol. El sitio activo contiene un centro metálico de Fe^{III} y se encuentra expuesto a la superficie. A continuación se muestra la reacción general de reducción de peróxidos con HRP.



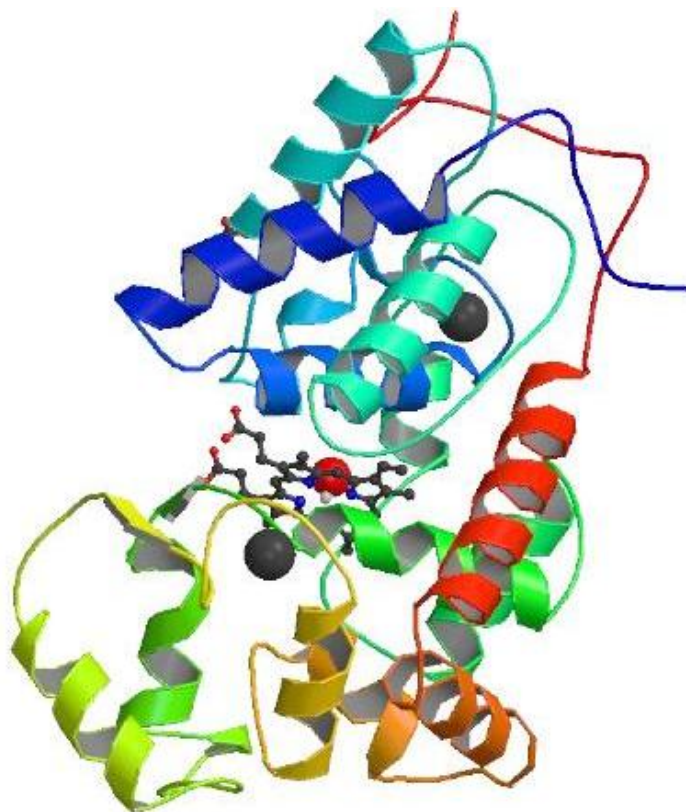
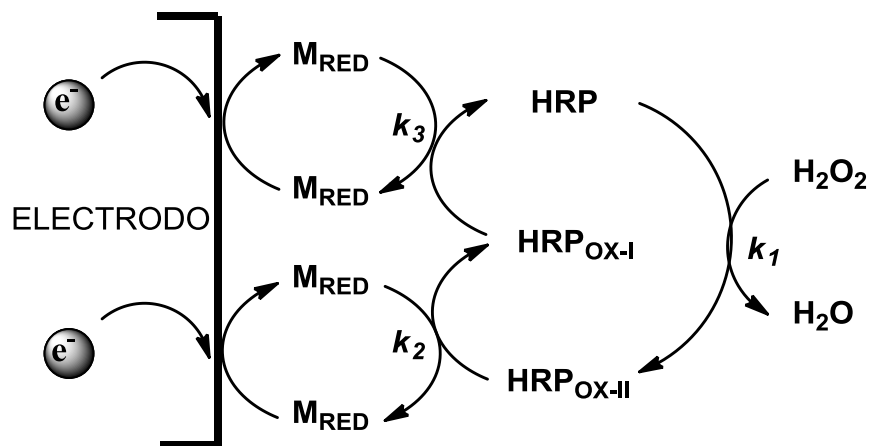


Figura 2.34. Estructura de la HRP. Imagen obteni de Protein Data Bank 1HCH

La reacción empieza con la oxidación de la enzima por H_2O_2 , y se forma el “complejo I” que es una especie radicalica de Fe^{IV} . A partir de esta especie se forma el “complejo II”, que es un complejo oxo de Fe^{IV} . Ambas especies son fuertemente oxidantes. Sin embargo, el complejo I es entre 10 y 100 veces más reactivo que el complejo II. Aunado a esto cuando se tiene una concentración de H_2O_2 mayor a 3 mM, el complejo II se vuelve a oxidar formando una tercera forma oxidada “complejo III” que puede reaccionar con oxígeno o con otra molécula donadora de electrones. Debido a todas las especies que pueden estar presentes y los equilibrios entre cada una de ellas y que las reacciones son simultaneas, el esquema que representa el mecanismo de reacción de esta enzima se vuelve muy complicado. Por tanto, se hacen aproximaciones experimentales, como utilizar concentraciones de H_2O_2 menores a 3 mM, lo que permite simplificar el mecanismo. De esta manera se ha llegado al siguiente esquema que representa la reacción de manera simplificada y permitió su estudio mediante voltamperometría cíclica con el uso de mediadores como donadores de electrones.⁵³



Esquema 2.5. Mecanismo de HRP utilizando mediadores de Ru y Os.

Es importante destacar que el uso de esta enzima es muy amplio a nivel industrial, y con ella se pueden hacer biosensores amperométricos para la determinación de peróxidos.

La catálisis enzimática representa muchas ventajas en síntesis química por lo que no es de sorprender que en recientes años las investigaciones se han centrado en modificar enzimas y replicar sus sitios activos para hacer nuevos catalizadores más poderosos y específicos.

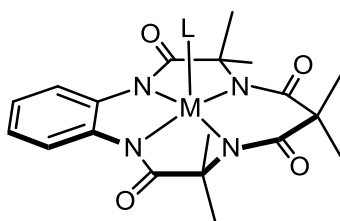
Entre las sustancias que mas se han estudiado con el propósito de emular los sitios activos de las enzimas, encontramos a las metaloporfirinas y metal ftalocianinas, que catalizan una variedad de reacciones orgánicas y tiene funcionalidad similar al citocromo P450 y la lignina peroxidasa.

2.3. Metal-TAML (ligante *tetraamido macrocíclico*)

Desde la década de los 1980's el grupo del doctor Collins se ha dedicado a la síntesis y el estudio de moléculas que asemejen las propiedades catalíticas de los citocromos. A lo largo de muchos años de investigación lograron desarrollar una familia de ligantes a la que denominaron TAML, los cuales pueden enlazar un metal y llevar a cabo una catálisis similar a la de las peroxidases. Actualmente los complejos Metal-TAML están siendo aplicados en procesos de purificación de aguas residuales entre otras cosas.⁵⁵

2.3.1. Diseño del M-TAML

El desarrollo de los sistemas M-TAML fue un largo proceso. Antes de proponer una estructura orgánica idónea que pudiera contener un metal y resistiera condiciones de hidrólisis oxidativa, fue necesario estudiar profundamente los procesos de degradación de moléculas orgánicas, debido a la presencia de metales en altos estados de oxidación. Una vez comprendido esto y teniendo en cuenta los grupos más resistentes a la hidrólisis oxidativa por efecto de metales, se propusieron las primeras estructuras para los ligantes, y a partir de una serie de mejoramiento sobre ellos, se llegó a una estructura que estuviese protegida del proceso degradativo.



M = Fe, Co, Ni, Cu, Mn

L = H₂O (disolvente)

Figura 2.35. Estructura de M-TAML

2.3.2. Complejos polianiónicos PAC

Como antesala de estos sistemas, se sintetizaron diversos complejos de quelatos polianiónicos (PAC), los cuales contienen 2 centros donadores *N*-amido y 2 donadores *O*-alcóxido. Cuando el PAC se encuentra completamente protonado, los metales pueden coordinarse débilmente a los 4 átomos donadores en el centro del quelato (los nitrógenos *N*-amido son donadores muy débiles debido a que el par de electrones no está completamente disponible). Sin embargo, al desprotonar los centros donadores se tiene una carga de -4 en el ligante y los nitrógenos *N*-amida se convierten en fuertes donadores σ , resultando en un ambiente que estabiliza metales en altos estados de oxidación. Debido a la gran densidad electrónica y la carga negativa del ligante, se produce una disminución en el potencial redox de los complejos metálicos. El bajo potencial redox permite que sean rápidamente oxidados por una variedad de componentes del mismo medio de reacción incluyendo el O₂, de tal forma que en los complejos obtenidos generalmente el metal se encuentra más oxidado que en su estado inicial (precursor). Además el uso de oxidantes

más fuertes como peróxidos, peroxiácidos o diacilperóxidos puede llevar a la formación de complejos oxo terminales con un estado de oxidación del metal aun mayor.⁵⁶⁻⁵⁸

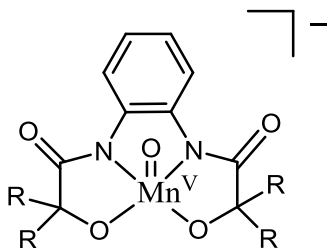


Figura 2.36. Complejo PAC de Mn^V

Los PAC poseen una estructura abierta que representa una desventaja en términos de estabilización de los complejos metálicos en altos estados de oxidación, y debido a la valencia del oxígeno, no pueden ser cíclicos en el alcóxido. La alternativa para su ciclización fue sustituir los átomos de oxígeno por nitrógeno. Tal modificación en los PAC llevó a la formación de los sistemas tetraamidos en los cuales no solo se resolvió el problema de la ciclización, además en este sistema el nitrógeno solo cuenta con un par de electrones libres que se mantiene ortogonal al par σ donador, lo cual disminuye el efecto de la degradación oxidativa haciendo un ligante mucho más robusto.⁵⁹

En 1979 Rybka reportó el primer macrociclo unido a un metal a través de un anion de amida.⁶⁰ Más tarde aparecieron los sistemas macrocíclicos con 2 y 3 grupos anionicos amida, pero en estos sistemas se tenía uno o más grupos donadores neutros como aminas donde el metal primero se coordina al grupo donador (amina), y después promovido por la proximidad con el metal se lleva a cabo la desprotonación y coordinación del grupo amida.

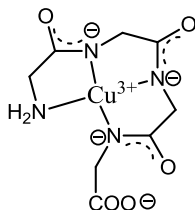


Figura 2.37. Complejo metálico poliamido N-donador

Puesto que los grupos amida no son σ donadores la inserción de metales en ligantes poliamida macrocíclicos libres de grupos donadores representó un nuevo reto. En 1980

Margerum y Rybka informaron la síntesis de un complejo *N*-tetraamido de Cu, producto de la introducción del metal al macrociclo tetraamido.⁶¹

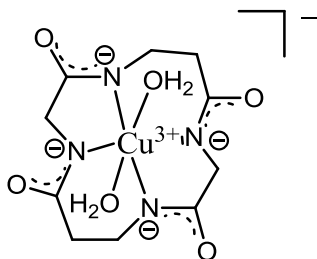


Figura 2.38. Primer Metal-Tetraamido macrociclo informado

En este tipo de sistemas, la alta resistencia a la oxidación por parte de los grupos amida, representó una mejor alternativa para sintetizar complejos que pudieran alojar metales en altos estados de oxidación. Del mismo modo que sucede con los PAC, los ligantes tetraamido cíclicos al ser desprotonados generan un ligante con carga 4- en el que se puede enlazar un metal, y debido a la alta capacidad σ donadora de los grupos *N*-amido, existe una gran densidad electrónica sobre el centro metálico. Como consecuencia el potencial redox del complejo disminuye aún más y el metal es fácilmente oxidado por el medio de reacción.⁵⁹

En los sistemas M-TAML, resulta muy común obtener complejos donde el metal tiene un estado de oxidación mayor al precursor de partida. Se encontró en los M-TAML de Fe y Mn, que el centro metálico podía ser oxidado con O₂ para formar complejos Fe^{IV}-TAML- μ -oxo y con peróxidos se formaban complejos Fe^{IV}-oxo y Mn^V-oxo.⁶²⁻⁶⁴

2.3.3. Estructura del TAML

El TAML es un ligante en cuya estructura se encuentran 4 grupos amida formando una cavidad central. Se ha dividido su esqueleto en 3 partes: la cavidad central, la cabeza y la cola. Sobre la estructura principal se han llevado a cabo diversas modificaciones. Por ejemplo sobre la cabeza usualmente se encuentra un anillo aromático, el cual puede estar sustituido por grupos electroattractores o electrodonadores (**A**). También se ha utilizado un anillo de piridina (**B**) y una cetona (**C**), y es a través de estos grupos que se pueden modular las propiedades electrónicas sobre el centro metálico. Por otro lado, tanto en la parte central

como en la cola, se pueden introducir diferentes grupos sustituyentes, los cuales modifican principalmente las propiedades estéricas sobre la cavidad central.

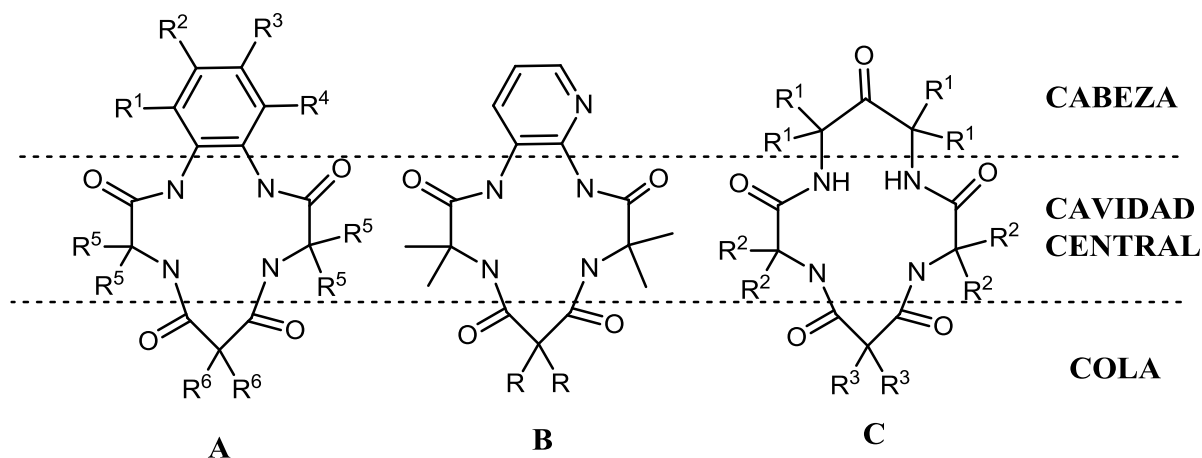


Figura 2.39. Modificaciones a la estructura del TAML^{65, 66}.

Los TAML's en general son moléculas simétricas, pero debido a su estructura cíclica adquieren diferentes conformaciones espaciales. Sin embargo, una vez que se lleva a cabo la metalación del ligante, es decir, cuando es desprotonado y se enlaza un metal en la cavidad central, el ligante adquiere una conformación de cuadrado plano. Cuando un TAML es desprotonado adquiere una carga de 4- y los 4 nitrógenos *N*-amido forman enlaces σ con el metal, obteniendo los complejos M-TAML. Aunado a la gran capacidad donadora del ligante, se tiene la formación alrededor del metal de 3 anillos de 5 miembros y uno de 6 miembros lo cual produce una gran estabilidad en los complejos metálicos. Dependiendo del metal y su estado de oxidación los complejos pueden adquirir estructura de cuadrado plano como ocurre con el Co^{III} o pirámide cuadrada como los casos de Fe^{IV} y Mn^{V} .

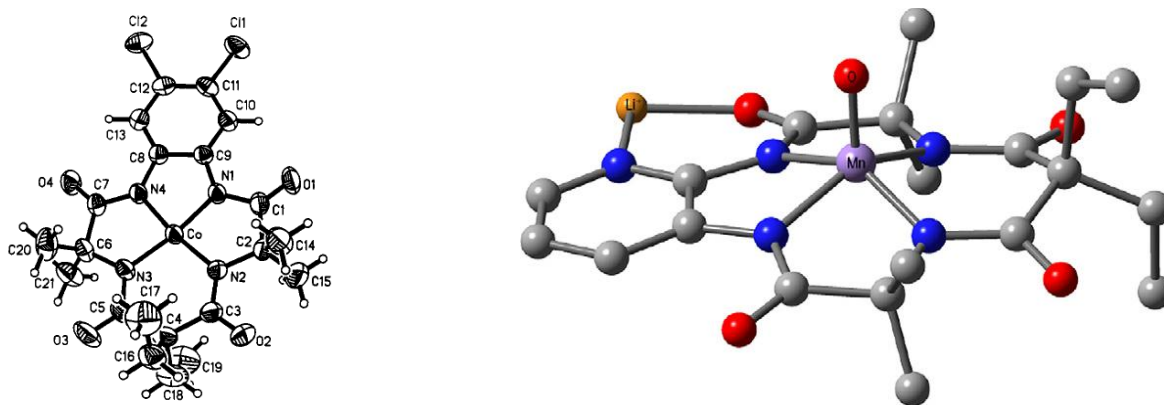


Figura 2.40. Estructuras de Co^{III} -TAML y Mn^{V} -TAML.^{66, 67}

Como se mencionó anteriormente, la estructura principal de los TAML's proviene de una serie de mejoras sobre los PAC's que permiten proteger el complejo de la degradación oxidativa. Se le llama degradación oxidativa debida al metal, a los procesos por los cuales ocurre la transferencia de electrones del ligante al centro metálico y terminan fragmentando la molécula. Estos se presentan como procesos destructivos y procesos no destructivos. La protección estructural del TAML para evitar los procesos destructivos, se basa en los siguientes puntos:

- Los carbonos del ligante en posiciones α a nitrógenos y β al metal se encuentran saturados y tienen sustituyentes alquílicos para evitar la destrucción debida a la reducción de 2 electrones en el centro metálico. Esta protección fue utilizada por Margerum con ligantes acíclicos, los H sustituyentes también pueden ser cambiados por grupos aromáticos (como ocurre en la cabeza del ligante **A** y **B** figura 2.39).

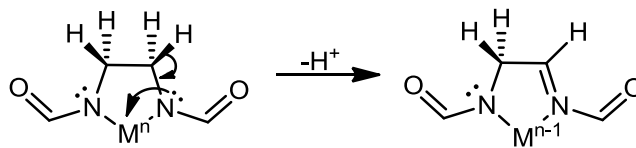


Figura 2.41. Hidrólisis oxidativa del ligante con sustituyentes H

- En el esqueleto principal del quelato, el ligante no debe contener sustituyentes con heteroátomos que contengan pares de electrones capaces de hacer un traslape significativo con orbitales σ^* de los enlaces C-C de los anillos de 5 miembros. Estos sustituyentes también promueven la destrucción por la reducción del metal en 2 electrones.

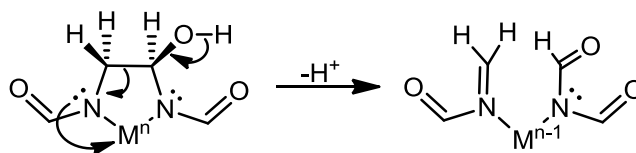


Figura 2.42. Hidrólisis oxidativa del ligante debida a sustituyentes con heteroátomos

- Los heteroátomos donadores en el quelato deben ser todos *N*-amido, ya que los pares de electrones del nitrógeno tienen un mínimo traslape con los orbitales σ^* de los enlaces C-C en el quelato de 5 miembros. Un rearrreglo provee de protección

contra la descomposición oxidativa debida a un rompimiento heterolítico que pudo ser observado en sistemas PAC con alcoholdos donadores.

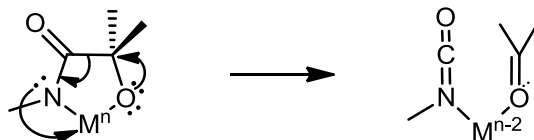


Figura 2.43. Hidrolisis oxidativa del ligante debida a heteroátomos en el quelato.

- Se cree que la estructura del macrociclo protege al ligante de la destrucción oxidativa debida a ruptura homolítica. Este tipo de descomposición oxidativa también fue observada en los ligantes PAC, no cíclicos.

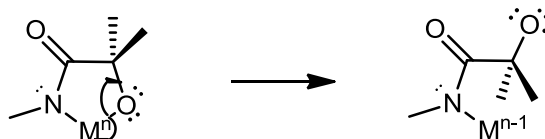


Figura 2.44. Destrucción del ligante por ruptura homolítica.

La protección para procesos no destructivos puede observarse solo en caso de la estructura del TAML C (figura 2.39), en donde el grupo sustituyente en la cabeza del ligante no se encuentra conjugado hasta el metal. A este se le llama un ligante inocente, puesto que casi no existe influencia electrónica desde el ligante hacia el metal. En caso de que los ligantes contengan grupos aromáticos en la cabeza (ejemplos **A** y **B** figura 2.39), se extiende un sistema π conjugado al centro metálico, lo que produce ambigüedades en el estado de oxidación formal del metal. A estos se les conoce como ligantes no inocentes.^{65, 66, 68.}

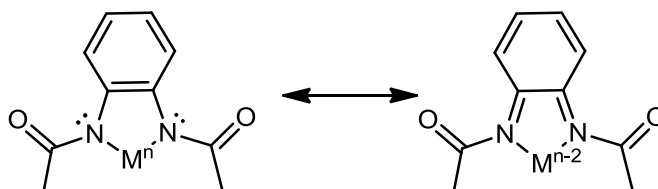


Figura 2.45. Proceso de oxidación no destructivo para ligantes con sistema π extendido

2.3.4. Metalación del TAML

La metalación del ligante es el proceso mediante el cual se introduce el metal en la cavidad del macrociclo. En el tetraamido reportado por Margerum y Rybka, este proceso se hizo utilizando disolución de NaOH y $\text{Cu}(\text{OH})_2$. Sin embargo, esta eacción no es funcional para

los nuevos sistemas. Actualmente, la metalación de los TAML's incluye el uso de disolventes anhidros como THF a baja temperatura y bases lo suficientemente fuertes para desprotonar los grupos amida del ligante (RLi, NaH). Una vez desprotonado el ligante, se introduce el metal en forma de una sal divalente para obtener un complejo hidrolíticamente estable, el cual puede ser oxidado.

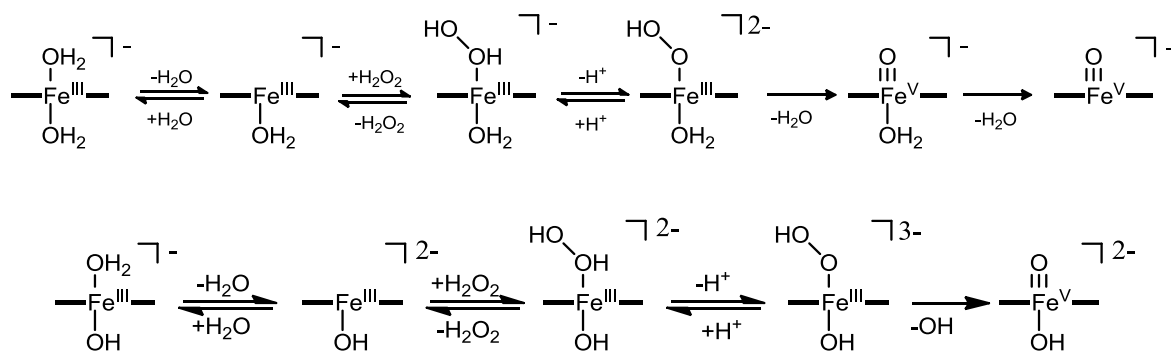
Entre los metales que se han utilizado se encuentran: Mn, Co, Cr, Fe, Ni y Cu, siendo los complejos de Fe los más utilizados y estudiados.^{64, 67, 69, 70.}

2.3.5. M-TAML como catalizador

Los complejos Fe-TAML funcionan de manera similar a las enzimas peroxidasas, así, como estas, los M-TAML's pueden reducir el H_2O_2 formando un complejo altamente oxidado el cual tiene función tipo catalasa. Estos complejos oxidados de M-TAML pueden oxidar y llegar a descomponer moléculas donadoras de electrones. Cuando no existen en el medio otros donadores de electrones, el mismo H_2O_2 funciona como donador de electrones y reacciona con el complejo M-TAML oxidado produciendo O_2 .

3.2.6. Actividad tipo peroxidasa

Se han llevado a cabo diversos estudios para determinar la cinética y el mecanismo de reacción del Fe-TAML, tanto en medio acuoso como en disolventes orgánicos. Además de ello, también se encontró que existe una dependencia de las especies producidas con el pH. Se llevaron a cabo diversos estudios para conocer las especies químicas que se forman durante la reacción entre el complejo Fe-TAML y el H_2O_2 , y a través de ello se pudieron proponer los siguientes mecanismos de reacción:

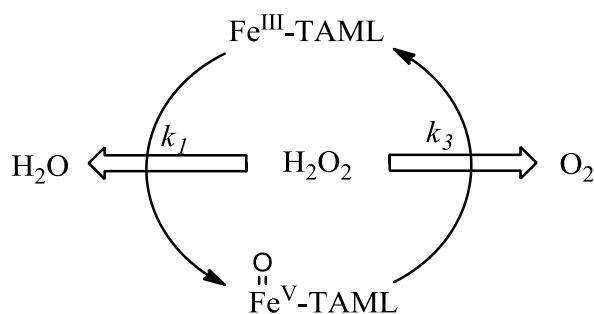


Esquema 2.6. Mecanismo de formación de complejos oxo en condiciones neutras (superior) y básicas (inferior)

Como se observa en el esquema 2.6, la disociación de un ligante H_2O permite generar un sitio vacante sobre el cual se coordina el peróxido. Para el Fe-TAML este paso es lento porque la constante de disociación de H_2O y H_2O_2 son similares. En caso de la HRP este paso es rápido porque existen interacciones entre H_2O o H_2O_2 con toda la estructura de la enzima, no solo en el sitio activo; lo que produce una diferencia entre ambas constantes de disociación. Una vez coordinado el peróxido, prosigue la oxidación del complejo por la pérdida de un H^+ que lleva a un cambio en la hibridación del átomo de oxígeno del peróxido. La ruptura heterolítica del enlace O-O conlleva a la pérdida de H_2O (se cree que este paso puede ocurrir a través de una reacción con una segunda molécula de H_2O_2), la oxidación del metal y la formación del complejo *oxo*. En disolventes poco polares se ha encontrado la formación de complejos $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{-}\mu\text{-oxo}$, el cual se trata de la especie altamente oxidada capaz de llevar a cabo la función tipo catalasa.

2.3.7. Actividad tipo catalasa.

Como se mencionó antes, el peróxido reacciona con el Fe-TAML para formar el complejo *oxo*-Fe-TAML (especie altamente oxidada), pero cuando el peróxido se encuentra en alta concentración, puede funcionar como reductor al reaccionar con el complejo *oxo*-Fe-TAML para producir O_2 y regenerar el complejo Fe-TAML. Así, aparecen 2 constantes (k) de velocidad entre el H_2O_2 y el Fe-TAML, una debida a la oxidación y otra por la reducción de la especie *oxo*-Fe-TAML, como se describe en el siguiente esquema:



Esquema 2.7. Comportamiento del Fe-TAML y H_2O_2 en ausencia de donadores de electrones.

A través de estudios cinéticos monitoreando la producción de O_2 con un electrodo de Clark se encontró una constante de velocidad $k_3 = 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

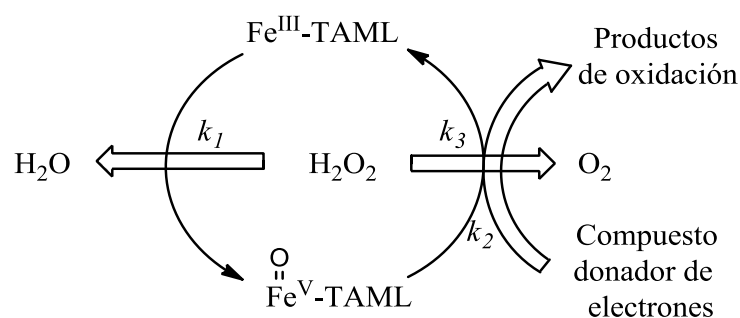
En la siguiente tabla se compara el valor de k_1 para el Fe-TAML y otros compuestos con funcionalidad similar.

Compuesto	$k_1 / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Referencia
Fe-tetrazaanuleno	1.5×10^3	71
Fe-TAML	1.8×10^4	74-76
Lignina H8 peroxidasa	1.4×10^5	72
Peroxidasa de rabano HRP	1.7×10^7	73

Tabla 2.3. Valores de k_1 de compuestos con actividad tipo peroxidasa.

La actividad del Fe-TAML es ligeramente superior a la Fe-tetrazaanuleno (otro catalizador inorgánico) y ligeramente menor a la lignina H8 peroxidasa, que es la peroxidasa con la menor actividad, pero si existe una gran diferencia comparada con la HRP

Cuando se tienen donadores de electrones la actividad tipo catalasa depende del compuesto donador. Generalmente la constante de velocidad k_2 es entre 10 y 100 veces mayor que la k_3 para el H_2O_2 , por lo cual en estudios cinéticos la componente debida a la reacción con H_2O_2 no puede ser completamente descartada.



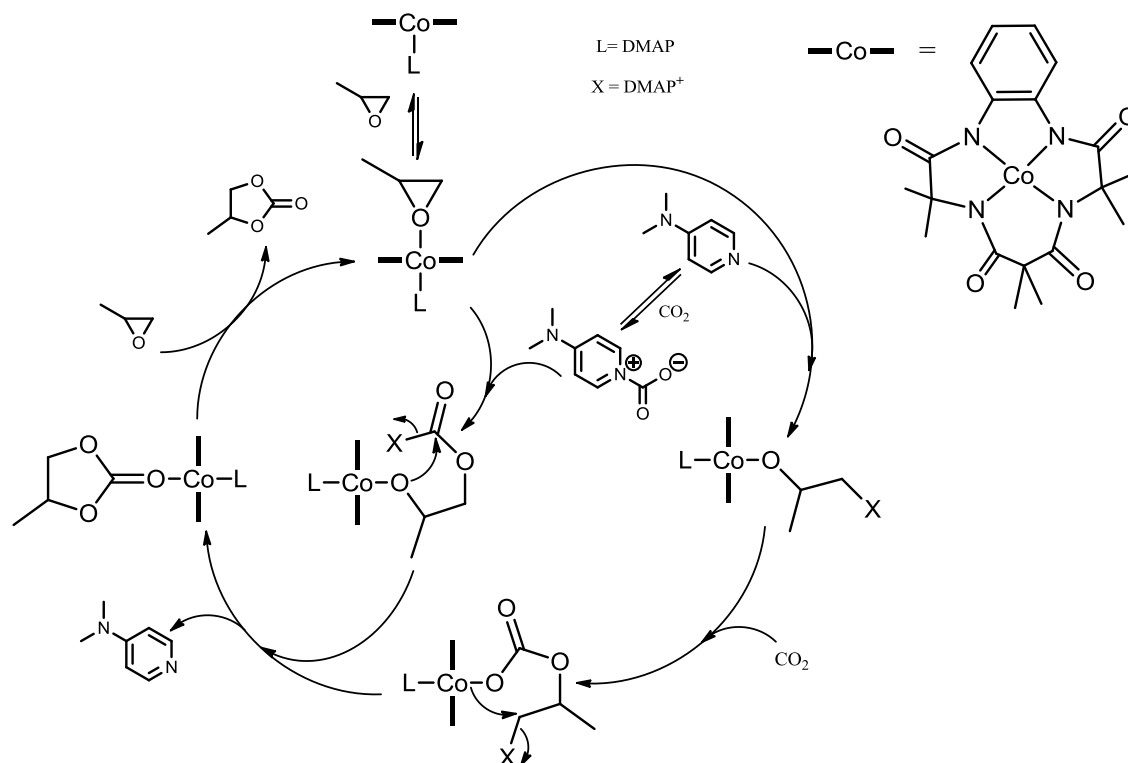
Esquema 2.8. Comportamiento del Fe-TAML en presencia de H_2O_2 y otras moléculas donadoras de electrones.

En cuanto a la actividad como catalasa en la oxidación de moléculas donadoras de electrones, los complejos organometálicos presentan una ventaja con respecto a las enzimas, y es que el centro catalítico se encuentra mucho más expuesto, lo que permite una catálisis más rápida e incluso permite la degradación de sustancias que no puedan ingresar

al sitio activo de enzimas, lo que ha permitido que el Fe-TAML pueda ser aplicado en tratamiento y purificación de agua.⁷⁴⁻⁷⁶

2.3.8. Catálisis del Co-TAML

Por su parte se encontró que el Co^{III} -TAML sirve como catalizador para la adición de CO_2 a epóxidos formando carbonatos cíclicos. Los mejores resultados se obtuvieron con oxido de propileno llegando a un rendimiento de 100 % con un $\text{TOF} = 351 \text{ h}^{-1}$ utilizando, 0.1 % mol de catalizador a 120°C , 2 MPa de presión de CO_2 durante 3 horas, y 0.2 % de DAMP como co-catalizador. También fue soportado en sílica gel y se recicló obteniendo un $\text{TON}_{\text{reciclado}}$ de 570 para el primer reciclado, 489 para el segundo reciclado y 301 para el tercer reciclado. El mecanismo propuesto para esta catálisis es el siguiente:



Esquema 2.9. Ciclo catalítico de adición de CO_2 a epóxidos mediada por el Co -TAML

El Co^{III} -TAML actúa como electrófilo, lo cual permite retirar densidad electrónica del epóxido facilitando la ruptura del mismo que es producida por un ataque nucleofílico en el carbono menos sustituido. Es por ello que los mejores rendimientos fueron obtenidos usando la DMAP que es más nucleofílica que otras aminas.⁷⁷⁻⁷⁹

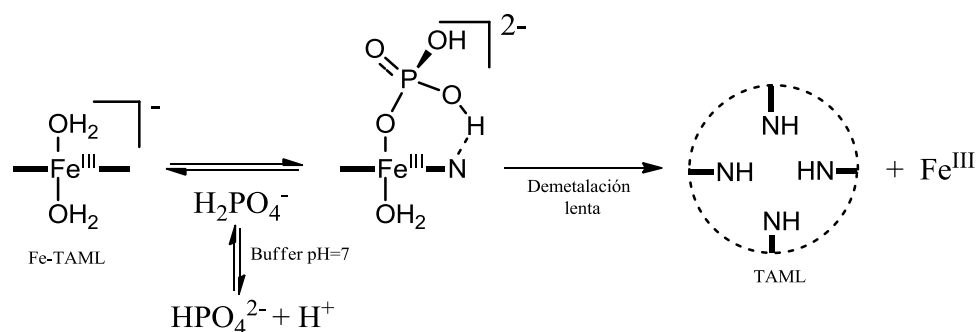
2.3.9. Procesos de degradación del M-TAML

Los complejos M-TAML pueden hidrolizarse por diferentes factores. Cuando el metal es biocompatible como el caso del Fe y Co representa una ventaja debido a que el complejo se degrada en pequeñas moléculas que no afectan al medio ambiente. Lo que es de suma importancia si consideramos que son utilizados para tratamiento de aguas.

2.3.10. Degradación por hidrólisis ácida y básica

Se ha encontrado que los Fe-TAML sufren una rápida demetalación a $\text{pH} < 3$ debido a la protonación de los grupos amida,⁸⁰ a pH alto también sufren la descomposición por la formación de hidróxidos metálicos.

El complejo es muy estable cuando se encuentra disuelto en agua pura (se puede mantener durante meses) pero cuando se encuentra en disolución amortiguadora de $\text{pH} = 7$ (buffer de fosfatos) ocurre una lenta demetalación del complejo que se nota en cuestión de horas. Esto debido a que las moléculas del amortiguador se pueden coordinar al centro metálico y promover la protonación de los grupos amida.



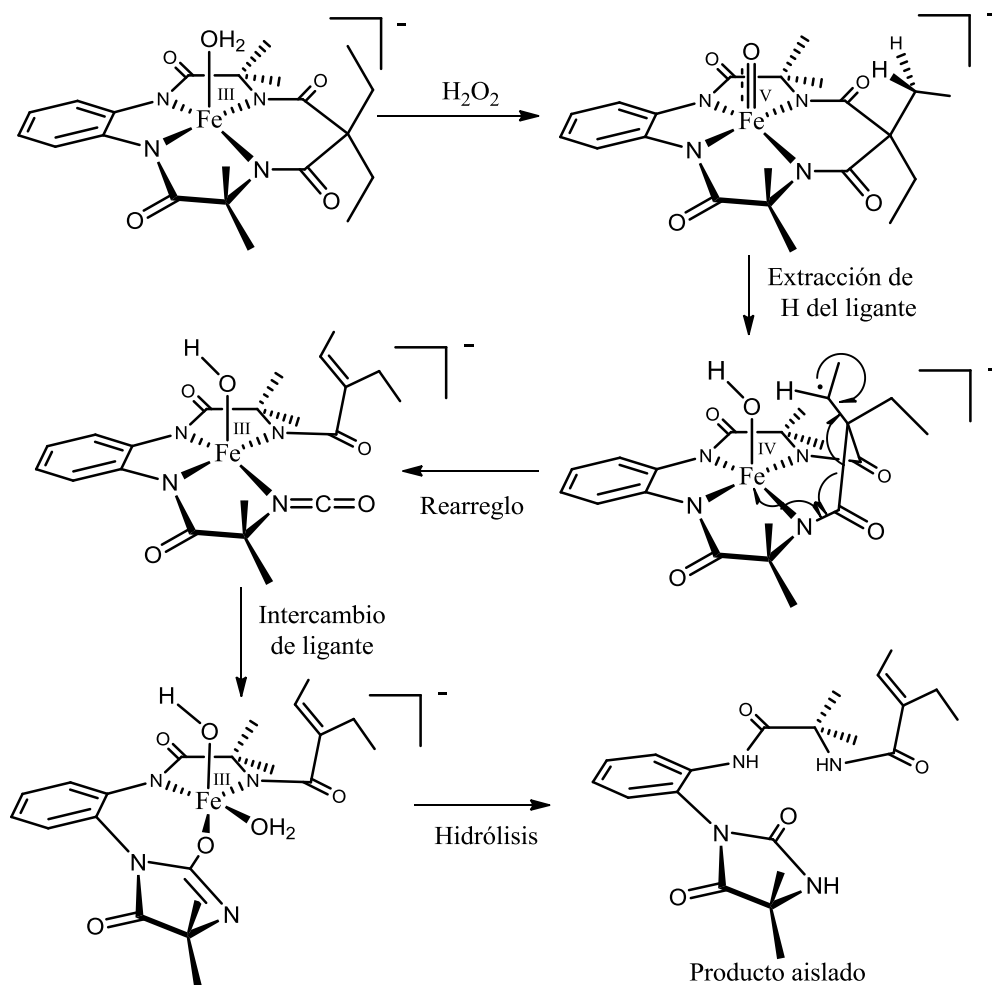
Esquema 2.10. Descomposición del Fe-TAML por amortiguador de fosfatos

Lo mismo ocurre con ligantes que contienen hidrógenos no ácidos que al coordinarse y aproximar el hidrógeno al *N*-amido promueven la protonación de los grupos amida, tal es el caso de piridinas y CH_3CN (en el último caso mucho más lento). Esto se confirma ya que al coordinar una azida se forma un complejo muy estable que no se demetala.

2.3.11. Degradación por condiciones oxidativas (autodegradación)

Aunque el complejo resiste las condiciones oxidativas a la cual es sometido, también ocurre una lenta degradación debido a la catálisis que se lleva a cabo. Se ha encontrado que

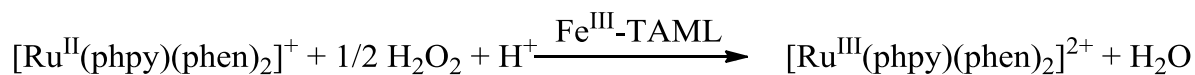
durante la formación del complejo *oxo*, los hidrógenos que se encuentran en la parte central y también la cola pueden ser extraídos por el Fe-*oxo* generando radicales que llevan a la destrucción del complejo.⁸¹



Esquema 2.11. Mecanismo de degradación del Fe-TAML por hidrólisis oxidativa

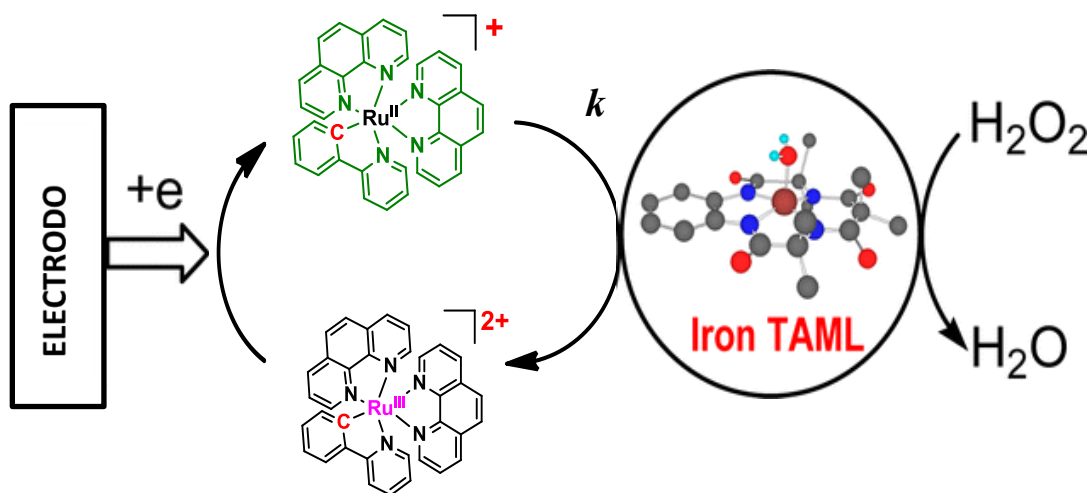
2.3.12. M-TAML y complejos de rutenio

Recientemente se han realizado estudios sobre la interacción entre el Fe-TAML y complejos ciclometalados de rutenio. En el primero se evaluó la función tipo catalasa del Fe-TAML en presencia de H_2O_2 y del complejo $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{phen})_2]^+$ como agente donador de electrones llevando a cabo la siguiente reacción:⁷⁴



A partir de ello se pudo dilucidar el mecanismo de acción propuesto anteriormente (esquema 2.4), debido a que el complejo de rutenio se oxida a Ru^{III} , pero no se destruye ni modifica su estructura como ocurre con los donadores orgánicos utilizados. Además es posible observar la concentración de cada especie a través de espectroscopía UV-Vis por lo que se pudo determinar la estequiometría de la reacción.⁷¹

Por otro lado, nuestro grupo de trabajo también estudió la interacción entre estas especies. En este caso el Fe-TAML fungió como peroxidasa sintética reduciendo H_2O_2 a agua, mientras el complejo de rutenio hizo la función de mediador transfiriendo los electrones desde el Fe-TAML oxidado hacia un electrodo, formando así un ciclo catalítico similar a cuando se utilizó la HRP. El estudio fue realizado mediante voltamperometría cíclica y se encontró que la constante de transferencia de electrones entre ambos complejos fue del orden $k = 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, resultado comparable a lo obtenido con la enzima.⁸²



Esquema 2.12. Ciclo catalítico producido entre Fe-TAML y complejo de rutenio con la reducción de H_2O_2

Este último trabajo fue enfocado hacia la aplicación en sensores de peróxidos, en él, se conjuntaron finalmente el Fe-TAML como peroxidasa sintética y el mediador de rutenio para crear un sistema que funciona como sensor amperométrico de peróxidos, sentando entonces la base de lo que será este trabajo.

2.4 Referencias

1. Griffith, W. P. *Chem Soc. Rev.*, **1992**, 179.
2. Kittaka, S.; Sakakibara, T.; Hedo, M.; Nuki, Y.; Machida, K. *J. Phys. Soc. Jpn.* **2013**, 82, 123706.
3. Verbiest, T.; Houbrechts, S.; Kauranen, K.; Clays, K.; Persoons, A. *J. Mater. Chem.* **1997**, 7, 2175.
4. a) Chang, K.; Liao, J.; Chen, C.; Metha, B. K.; Chou, P.; Fang, J. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 2026 b) Fillaut, J.; Andries, J.; Marwaka, R. D.; Laone, P.; Lohio, O.; Toupet, L.; Gareth, W. *J. Organomet. Chem.* **2008**, 693, 228.
5. Larionova, J.; Mombielli, B.; Sanchiz, J.; Kahn, O. *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 679.
6. Singh, S. K.; Joshi, S.; Singh, A. R.; Saxena, J. K.; Pandey, D. S. *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 10869.
7. Vidimar, V.; Meng, X.; Klajner, M.; Licon, C.; Fetzer, L.; Harlepp, S.; Hebraud, P.; Sidhoum, M.; Sirlin, C.; Loeffler, J-P.; Mellitzer, G.; Sava, G.; Pfeffer, M.; Gaidon, C. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, 84, 1428.
8. Saito, Y.; Azechi, T.; Kitamura, T.; Hasegawa, Y.; Wada, Y.; Yanagida, S. *Coord. Chem. Rev.* **2004**, 248, 1469.
9. Juris, A.; Balzani, V.; Barigelletti, F.; Campagna, S.; Belser, P.; von Zelewsky, A. *Coord. Chem. Rev.* **1988**, 84, 85.
10. Omae, I. *Chem. Rev.* **1979**, 79, 287.
11. Ryabov, A. D. *Chem. Rev.*, **1990**, 90, 403.
12. Snieckus, V. *Chem. Rev.* **1990**, 90, 879.
13. Gilman, H.; Bedd, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, 61, 109.
14. Wittig, G.; Fuhrman, G. *Chem. Ber.* **1940**, 73, 1147.
15. Puterbaugh, W. H.; Hauser, C. R. *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 853.
16. Gilman, H.; Jacoby, A. L. *J. Org. Chem.* **1938**, 3, 108.
17. a) Slocum, D. W.; Stonemark, F. E. *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 1677. b) Toniolo, L.; McGinnety, J. A.; Boschi, T.; Deganello, G. *Inorg. Chim. Acta.* **1974**, 11, 143. c) Kuszewski, J. R.; Lennarz, W. J.; Snyder, H. R. *J. Org. Chem.* **1968**, 33, 4479.
18. Djukic, J-P.; Sortais, J-B.; Barloy, L.; Pfeffer, M. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 817.

19. Ceron-Camacho, R.; Hernandez, S.; Le Lagadec, R.; Ryabov, A. D. *Chem. Comm.* **2011**, 47, 2823.
20. Peña, B.; Leed, N. A.; Dunbar, K. R.; Turro, C. J. *J. Phys. Chem C*. **2012**, 116, 22186.
21. a) Ma, W.; Ackerman, L. *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 13925. b) Yamamoto, Y.; Kinpara, K.; Saigoku, T.; Nishiyama, H.; Itoh, K. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 1287. c) Ackerman, L.; Diers, M.; Manvar, A. *Org. Lett.* **2012**, 14, 1154.
22. Amoroso, D.; Jabri, A.; Yap, G. P. A.; Gusev, D. P.; dos Santos, E. N.; Fogg, D. E. *Organometallics* **2004**, 23, 4047.
23. Sortais, J-B.; Ritleng, V.; Voelklin, A.; Holuigue, A.; Smail, H.; Barloy, L.; Sirlin, C.; de Vries, A. H. M.; de Vries, J. G.; Pfeffer, M. *Org. Lett.* **2005**, 7, 1247.
24. Hijazi, A.; Parkhomenko, K.; Djukic, J-P.; Chemmi, A.; Pfeffer, M. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350, 1493.
25. Kumar, S.; Fukuda, R.; Eahara, M.; Tanaka, K. *Inorg. Chem.* **2012**, 51, 5386.
26. Ben-Asuly, Aharon, A.; Diesendruck, C. E.; Vidasvsky, Y.; Goldberg, I.; Straub, B. F.; Lemcoff, M. G. *Organomet.* **2009**, 28, 4652.
27. Vargas-Alfredo, N.; Espinosa-Jalapa, N.; Lopez-Morales, S.; Ryabov, A. D.; Le Lagadec, R.; Alexandrova, L. *Macromolecules*, **2012**, 45, 8135.
28. Boff, B.; Ali, M.; Alexandrova, L.; Espinosa-Jalapa, N. A.; Saavedra-Díaz, R. O.; Le Lagadec, R.; Pfeffer, M. *Organometallics*, **2013**, 32, 5092.
29. Leyva, L.; Rubio, L.; Franco, C.; Le Lagadec, R.; Spencer, J.; Bischoff, P.; Gaiddon, C.; Loeffler, J. P.; Sirlin, C.; Pfeffer, M. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 3055.
30. Clark, G. R.; Rickard, C. E. F.; Roper, W. R.; Wright, L. J.; Yap, V. P. D. *Inorg. Chim. Acta.* **1996**, 251, 65.
31. Le Lagadec, R.; Rubio, L.; Alexandrova, L.; Toscano, R. A.; Ivanova, E. V.; Meskys, R.; Laurinavičius, V.; Pfeffer, M.; Ryabov, A. D. *J Organomet. Chem.* **2004**, 689, 4820.
32. Alpeeva, I. S.; Soukharev, V. S.; Alexandrova, L.; Shilova, N. V.; Bovin, N. V.; Csöregi, E.; Ryabov, A. D.; Sakharov, I. Y. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, 8, 683.
33. a) Le Lagadec, R.; Alexandrova, L.; Estevez, H.; Pfeffer, M.; Laurinavičius, V.; Razumiene, J.; Ryabov, A. D. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 2735. b) Ryabov, A. D.;

- Soukharev, V. S.; Alexandrova, L.; Le Lagadec, R.; Pfeffer, M. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 6598.
34. Ryabov, A. D.; Firsova, Y. N.; Ershov, A. Y.; Dementiev, I. A. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 175.
35. Price, N. C.; Stevens, L. *Fundamentals of Enzymology*, 3rd Edition **1999**, Oxford University Press, New York.
36. Mathews, C. K.; Van Hole, K. E.; Ahem, K. G. *Biochemistry*, 3rd Edition **2000**, International Edition, San Francisco California, Addisson-Wesley.
37. Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayers, P. A.; Rodwell, V. W. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 26th Edition, Mc Graw Hill **2003**, Toronto, Ontario, Nashville, Tennessee, London, West Lafayette, Indiana.
38. Ray, W. J. *Biochem.* **1983**, *22*, 4625.
39. Hansen, D. E.; Raines, R. T. *J. Chem. Educ.* **1990**, *67*, 483.
40. Lineweaver, H.; Burk, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 658.
41. Amyes, T. L.; O'Donoghue, A. C.; Richard, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11325.
42. Raines, R. T.; Hansen, D. E. *J. Chem. Educ.* **1988**, *65*, 757.
43. Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principios de biquímica* 4th Edition **2005**, Omega, Barcelona, España.
44. Laidler, K. J. *Chemical Kinetics* 3rd Edition **1987** Harper Collins *Publishers*, Inc, New York, NY.
45. Kurland, I. J.; Pilgis, S. J. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 1023.
46. a) Blandford, C. F. *Chem. Comm.* **2013**, *49*, 11130. b) Wilson, R.; Turner, A. P. F. *Biosens. Bioelectron.* **1992**, *7*, 165. c) Ryabov, A. D. *Adv. Inorg. Chem.* **2004**, *55*, 201.
47. Kanwisher, J. *Limnology and Oceanography* **1959**, *4*, 210.
48. Clark Jr., L. C.; Wolf, R.; Granger, D.; Tylor, Z. *J. Appl. Physiol.* **1953**, *6*, 189.
49. Cass, A. E. G.; Davis, G.; Francis, G. D.; Hill, H. A. O.; Aston, W. J.; Higgins, I. J.; Plotkin, E. V.; Scot, L. D. L.; Turner, A. P. F. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 668.
50. Tirkes, S.; Toppare, L.; Alkan, S.; Bakir, U.; Onen, A.; Yagci, Y. *Int. J. Biol. Macromol.* **2002**, *30*, 81.

51. a) Brahim, S.; Narinesingh, D.; Guiseppi-Elie, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *18*, 69. b) Pan, D.; Chen, J.; Yao, S.; Nie, L.; Xia, J.; Tao, W. *Sens. Actuators, B.* **2005**, *104*, 68. c) Wang, J. *Electroanalysis*, **2001**, *13*, 983.
52. Bourdillon, C.; Demaille, C.; Moiroux, J.; Saveant, J.-M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2.
53. Ryabov, A. D.; Sukharev, V. S.; Alexandrova, L.; Le Lagadec, R.; Pfeffer, M. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6529.
54. Ryabov, A. D.; Soukharev, V. S.; Alexandrova, L.; Le Lagadec, R.; Pfeffer, M. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 6598.
55. Chahbane, N.; Lenoir, D.; Souabi, S.; Collins, T. J.; Schramm, K. W. *Clean: Soil, Air, Water*, **2007**, *35*, 459.
56. Collins, T. J.; Gordon-Wylie, S. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4511.
57. Collins, T. J.; Richmond, T. G.; Santarsiero, B. D.; Treco, B. G. R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2088.
58. Brewer, J. C.; Collins, T. J.; Smith, M. R.; Santarsiero, B. D. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 423.
59. Popescu, D.-L.; Chanda, A.; Stadler, M.; de Oliveira, F. T.; Ryabov, A. D.; Münck, E.; Bominaar, E. L.; Collins, T. J. *Coord. Chem. Rev.*, **2008**, *252*, 2050.
60. Rybka, J. S.; Margerum, D. W. *Inorg. Chem.*, **1981**, *20*, 1453.
61. Margerum, D. W.; Rybka, J. S. *Inorg. Chem.*, **1980**, *19*, 2784.
62. Collins, T. J.; Uffelman, E. S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 1509.
63. Ghosh, A.; de Oliveira, F. T.; Yano, T.; Nishioka, T.; Beach, E. S.; Kinoshita, I.; Münck, E.; Ryabov, A. D.; Horwitz, C. P.; Collins, T. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 2505.
64. Collins, T. J.; Powell, R. D.; Slebodnick, C.; Uffelman, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 899.
65. Collins, T. J.; Kostka, K. L.; Uffelman, E. S.; Weinberger, T. L. *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 4202.
66. Miller, C. G.; Gordon-Wylie, S. W.; Horwitz, C. P.; Strazisar, S. A.; Peraino, D. K.; Clark, G. R.; Weintraub, S. T.; Collins, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11540.

67. Collins, T. J.; Powell, R. D.; Slebodnick, C.; Uffelman, E. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8419.
68. Collins, T. J. *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 279.
69. Collins, T. J.; Slebodnick, C.; Uffelman, E. S. *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 3433.
70. Collins, T. J.; Nichols, T. R.; Uffelman, E. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4708.
71. Paschke, J.; Kirsch, M.; Korth, H-G.; de Groot, H.; Sustmann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11099.
72. Andrawis, A.; Johnson, K. A.; Tien, M. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 1195.
73. Dolman, D.; Newell, G. A.; Thurlow, M. D.; Dunford, H. B. *Can. J. Biochem.* **1975**, *53*, 495.
74. Ghosh, A.; Mitchell, D. A.; Chanda, A.; Ryabov, A. D.; Popescu, D-L.; Upham, E. C.; Collins, G. J.; Collins, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15116.
75. Ellis, W. C.; Tran, C. T.; Denardo, M. A.; Fischer, A.; Ryabov, A. D.; Collins, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18052.
76. Gupta, S. S.; Stadler, M.; Noser, C. A.; Ghosh, A.; Steinhoff, B.; Lenoir, D.; Horwitz, C. P.; Schramm, K-W.; Collins, T. J. *Science*, **2002**, *296*, 326.
77. Ghosh, A.; Ramidi, P.; Pulla, S.; Sullivan, S. Z.; Collom, S. L.; Gartia, Y.; Munshi, P.; Biris, A. S.; Noll, B. C.; Berry, B. C. *Catal. Lett.* **2010**, *137*, 1.
78. Aida, T.; Inoue, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 1304.
79. Lu, X-B.; Liang, B.; Zhang, Y-J.; Tian, Y-Z.; Wang, Y-M.; Bai, C-X.; Wang, H.; Zhang, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3732.
80. Ghosh, A.; Ryabov, A. D.; Mayer, S. M.; Horner, D. C.; Prasuhn, D. E. Jr.; Sen Gupta, S.; Vuocolo, L.; Culver, C.; Hendrich, M. P.; Rickard, C. E. F.; Norman, R. E.; Horwitz, C. P.; Collins, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12378.
81. Bartos, M. J.; Gordon-Wylie, S. W.; Fox, B. G.; Wrigth, L. J.; Weintraub, S. T.; Kauffmann, K. E.; Münck, E.; Kostka, K. L.; Uffelman, E. S.; Rickard, C. F.; Noon, K. R.; Collins, T. J. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *174*, 361.
82. Ryabov, A. D.; Camacho-Cerón, R.; Saavedra-Díaz, O.; Denardo, M. A.; Ghosh, A.; Le Lagadec, R.; Collins, T. J. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 9096.

3. HIPÓTESIS.

- Una molécula bimetalica que contenga 2 fragmentos interconectados por enlaces π conjugados, siendo el primer fragmento un centro catalítico capaz de reducir peróxidos, y el segundo una entidad que pueda intercambiar electrones con este centro catalítico y un electrodo, permitirá aumentar la velocidad de intercambio de electrones entre ambos centros metálicos y disminuir interferencias en la cuantificación de peróxidos con un sistema amperométrico, por lo que tendrá un mayor potencial para ser aplicado como sensor de peróxidos.
- Los complejos de rutenio al ser capaces de llevar a cabo reacciones redox con el sitio activo de la glucosa oxidasa, pueden tener diferentes efectos sobre la reacción de oxidación de glucosa con glucosa oxidasa dependiendo de las propiedades electrónicas del centro metálico.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos generales:

- Sintetizar un complejo bimetalico que contenga un fragmento organometálico M-TAML y un complejo ciclometalado de rutenio en una molécula para conjuntar la función de peroxidasa sintética que posee el M-TAML y el mediador de electrones en el complejo de rutenio, capaz de intercambiar electrones entre el centro catalítico y un electrodo.
- Llevar a cabo un estudio cinético para conocer los efectos de complejos de rutenio sobre la reacción de oxidación de β -D-glucosa con glucosa oxidasa.

4.2. Objetivos particulares:

- Diseñar y sintetizar un ligante tetraamido macrocíclico (TAML) modificado, en cuya estructura posea una sección con esqueleto de TAML para introducir un metal en la cavidad formada por 4 amidas y otra sección con un quelato polipiridínico en la parte exterior capaz de coordinarse a un átomo de rutenio. Ambos fragmentos deben estar comunicados electrónicamente a través de enlaces π conjugados.
- Llevar a cabo la metalación del ligante TAML modificado.
- Diseñar complejos de rutenio con la 2-fenilpiridina ciclometalada conteniendo ligantes lábiles que puedan ser desplazados por el fragmento polipiridínico del TAML modificado.
- Coordinar el ligante TAML modificado en un complejo ciclometalado de rutenio para obtener el complejo bimetalico.
- Estudiar las propiedades redox del complejo bimetalico.
- Estudiar y obtener parámetros cinéticos de la reacción de oxidación de glucosa por la glucosa oxidasa, en presencia de complejos de rutenio a través del monitoreo de la concentración de O_2 .
- Determinar el efecto de los complejos de rutenio mediante el análisis de los parámetros cinéticos obtenidos.

5. Complejos ciclometalados de rutenio.

En este capítulo se describe la síntesis de complejos ciclometalados de Ru^{II} . Estos complejos deben tener un fragmento ciclometalado de 2-fenilpiridilo (phpy) y ligantes lábiles que permitan la sustitución de ligantes por quelatos de polipiridina. El objetivo de sintetizar estos complejos de rutenio, es poder coordinar al rutenaciclo, la polipiridina de un TAML modificado. Para esto, se plantearon 2 posibilidades: una por sustitución de los ligantes, coordinando directamente el TAML modificado; y otra sintetizando un complejo de rutenio con polipiridinas, en el cual un ligante posea grupos funcionales apropiados para hacer una reacción de condensación, y construir el TAML sobre el ligante ya coordinado al rutenio.

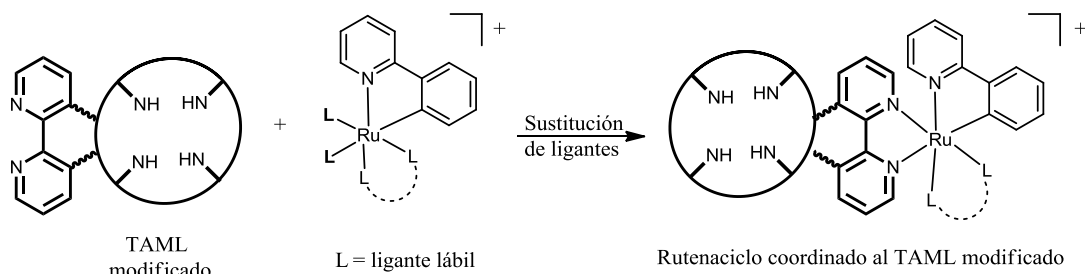
5.1. Primer propuesta: complejos con ligantes lábiles

Diversos complejos ciclometalados de rutenio han sido sintetizados con ligantes polipiridínicos y han mostrado una alta afinidad en la interacción con enzimas redox y recientemente con el Fe-TAML.

Tomando en cuenta la primera propuesta basada en la sustitución de ligantes, encontramos que se requería de complejos de rutenio en cuya estructura se tuvieran al menos 2 ligantes monodentados, que pudieran ser sustituidos por un ligante bidentado. Aunque existen diversos ejemplos de complejos de rutenio que poseen esta característica, una segunda condición estriba en que el complejo debe contener un fragmento ciclometalado con phpy. En trabajos previos se ha informado sobre la formación del metalociclo en reacciones posteriores a la sustitución de ligantes; sin embargo, resulta mucho más complicada y se lleva a cabo a través de reacciones de transmetalación.^{1,2} Debido a ello se buscó hacer la sustitución de ligantes a partir de especies de rutenio que ya tuvieran el fragmento ciclometalado.

Cumpliendo estas 2 condiciones, nos encontramos con complejos de rutenio que contienen ligantes acetonitrilo, los cuales han sido exitosamente sustituidos por fenantrolina o bipyridina.^{3,4} Basados entonces en la sustitución de ligantes, se propuso sintetizar complejos de rutenio con ligantes acetonitrilo, para ser utilizados como precursores y poder coordinar

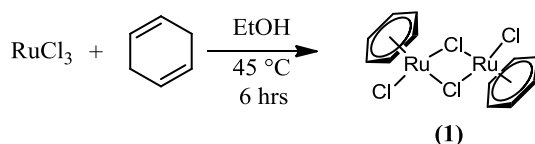
un TAML modificado en el metal (con un fragmento de polipiridina en la estructura del TAML).



Esquema 5.1. Primera propuesta para sintetizar el rutenacilo unido al TAML

5.1.1. Precursor $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Cl}_2]_2$ (1)

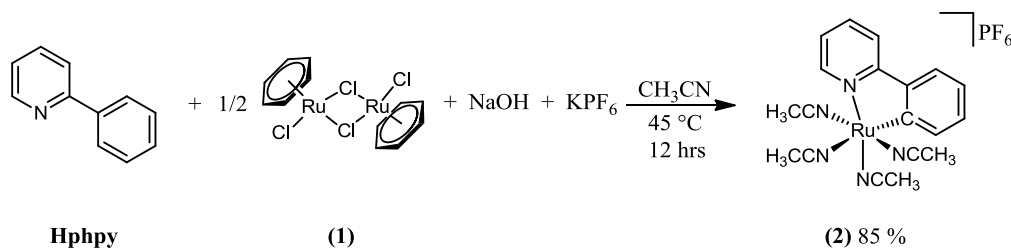
El complejo se preparó por calentamiento de disolución etanólica de $\text{RuCl}_3 \cdot \text{xH}_2\text{O}$ y 1,4-ciclohexadieno siguiendo la ruta informada en la literatura.⁵ Este complejo es comúnmente utilizado como precursor debido a que los puentes cloro se pueden romper fácilmente y ser sustituidos por moléculas de disolvente.



Reacción 5.1. Síntesis de $[\text{Ru}(\text{C}_6\text{H}_6)\text{Cl}_2]_2$

5.1.2. $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$ (2)

Este complejo fue preparado a partir del precursor **1** en acetonitrilo con 2-fenilpiridina, como se informa en la literatura.³ Durante esta reacción ocurre la ciclometalación de la 2-fenilpiridina en posición *orto*, por activación C-H directa y se sabe que ocurre vía un mecanismo de sustitución electrofílica.⁶ Se utilizó NaOH como base para neutralizar el HCl formado. También se utilizó KPF_6 para tener un anión lo suficientemente grande que permita estabilizar el complejo. Este complejo cuenta con el fragmento ciclometalado y los ligandos acetonitrilo que pueden ser sustituidos, condiciones necesarias para utilizarlo como precursor en la sustitución de ligantes con el TAML modificado.



Reacción 5.2. Síntesis de $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$

5.1.3. $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{CH}_3\text{CN})_3(\text{CO})]\text{PF}_6$ (3)

El CO puede retirar densidad electrónica del centro metálico por retrodonación y permite una mayor estabilidad del complejo (comparado con **2**), por esto, con el precursor **3**, se espera evitar la descomposición del mismo durante la sustitución de ligantes, y abre la posibilidad de labilizar CO de forma específica para promover el intercambio de ligantes.

Se preparó al burbujear CO en una disolución del complejo **2** en CH_2Cl_2 . Durante la reacción se observó la desaparición del color amarillo del precursor **2**. En el espectro de infrarrojo del producto obtenido se observa la aparición de una banda muy intensa en 1989 cm^{-1} que confirma la coordinación del CO. También se puede ver la señal de νPF_6^- en 834 cm^{-1} y una muy pequeña banda en 2291 cm^{-1} debida a la vibración (νCN) del acetonitrilo. En el espectro de masas se observa el ion molecular $[\text{M}]^+ = 407\text{ m/z}$ y las pérdidas correspondientes al CO $[\text{M}-\text{CO}]^+ = 379\text{ m/z}$ y a cada uno de los acetonitrilos $[\text{M}-\text{CO}-\text{CH}_3\text{CN}]^+ = 338\text{ m/z}$, $[\text{M}-\text{CO}-2\text{CH}_3\text{CN}]^+ = 297\text{ m/z}$ y $[\text{M}-\text{CO}-3\text{CH}_3\text{CN}]^+ = 256\text{ m/z}$.

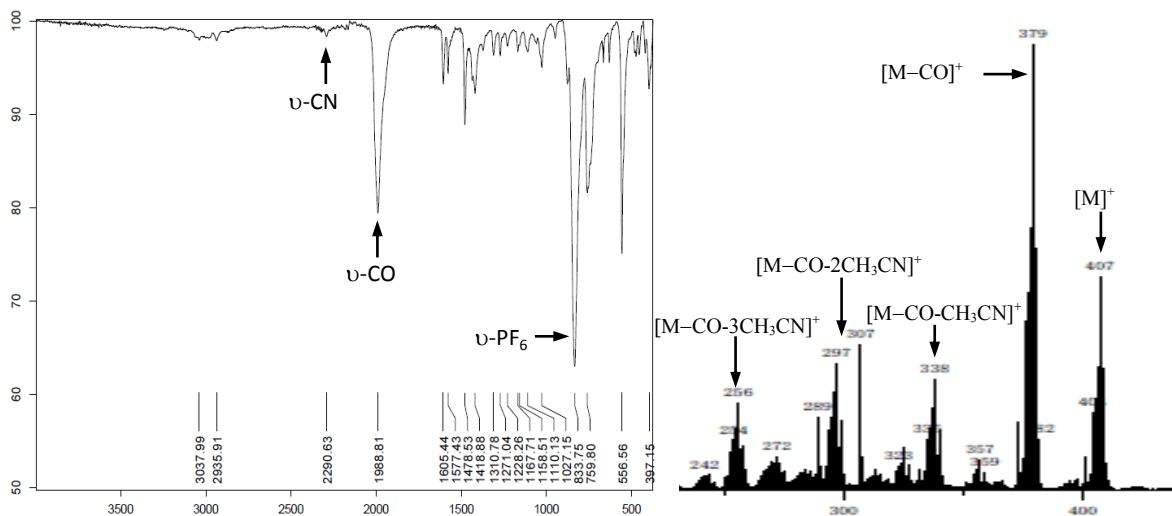


Figura 5.1. Espectro de infrarrojo por ATR en sólido (izquierda) y espectro de masas FAB⁺ (derecha) del complejo 3.

En el espectro de RMN ^1H se observan señales que integran para 8 hidrógenos aromáticos adjudicadas al ligante phpy. En la zona alifática podemos encontrar una señal en 2.12 ppm que integra para 6 hidrógenos y es asignada a los 2 acetonitrilos coordinados que se encuentran en posición *trans* entre sí. También se observa una señal en 2.61 ppm que integra para 3 hidrógenos y se asignó al acetonitrilo en posición *trans* al nitrógeno del ligante phpy. (Anexo A1)

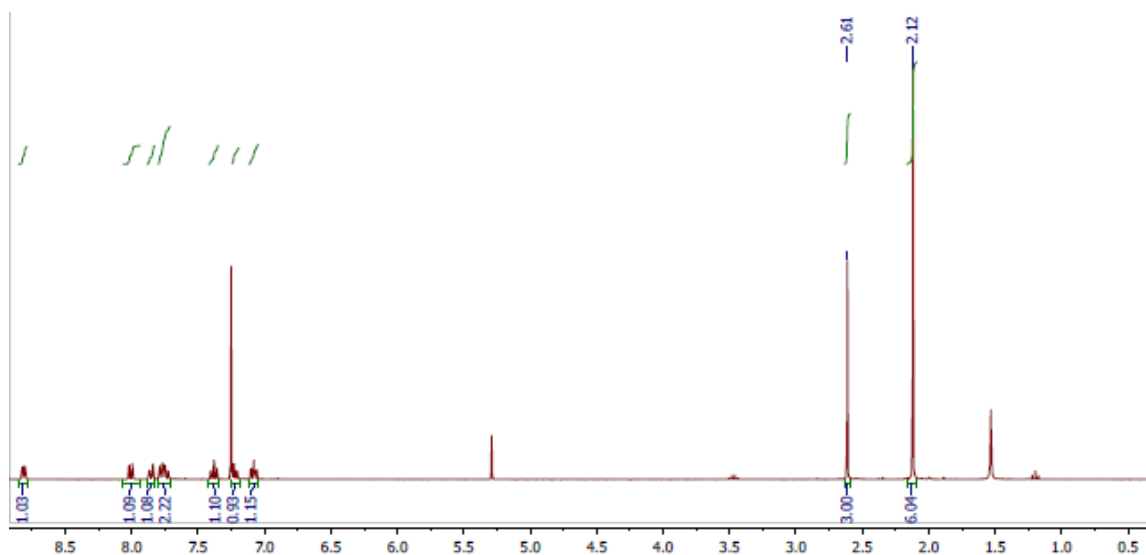


Figura 5.2. RMN ^1H en CDCl_3 del complejo 3

Además fue posible obtener cristales apropiados para estudios por difracción de rayos X.

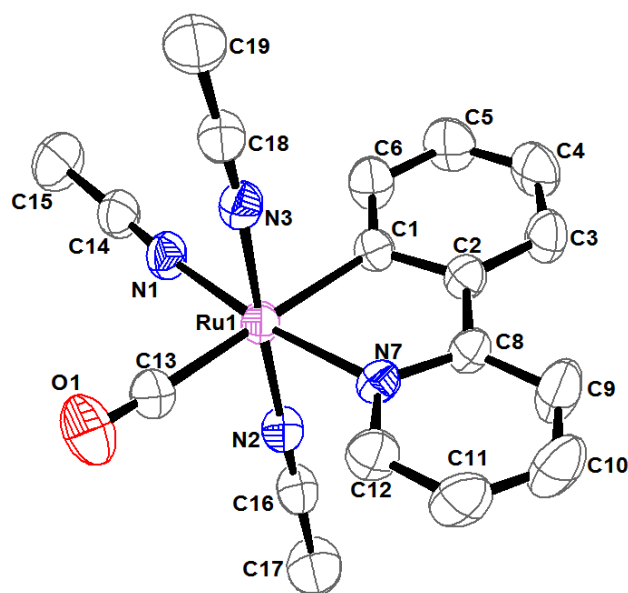


Figura 5.3. Estructura del complejo 3 obtenida por difracción de rayos X, para mayor claridad se omitieron los átomos de hidrogeno y el anion PF_6^- .

Parámetro	Complejo 3	Parámetro	Complejo 3
Formula empírica	C ₁₈ H ₁₇ F ₆ N ₄ OPRu	Rango θ de colección de datos (°)	2.402 a 27.498
Peso formula	551.39	Datos/restricciones/parámetros	4972 / 271 / 338
Temperatura (K)	298	Reflexiones colectadas	17892
Longitud de onda (Å)	0.71073	Reflexiones independientes	4972 [$R(\text{int}) = 0.0676$]
Sistema cristalino	Triclinico	Corrección de absorción	semi-empírica de equivalente
Grupo espacial	$P-1$	Método de refinamiento	cuadrados mínimos
Dimensiones de la celda unitaria en (Å y °)	$a = 6.9013$ $\alpha = 94.991$ $b = 12.5429$ $\beta = 99.797$ $c = 12.7887$ $\gamma = 90.568$	Rango de índices	$-8 \leq h \leq 8$ $-16 \leq k \leq 16$ $-16 \leq l \leq 16$
Volumen (Å ³)	1086.4	Calidad de ajuste en F^2	1.076
Z	2	Índices finales $R[I > 2\sigma(I)]$	$R1 = 0.0396$, $wR2 = 0.1000$
Densidad (Mg/m ³)	1.686	Índices R (todos los datos)	$R1 = 0.0456$, $wR2 = 0.1070$
Coefficiente de absorción (mm ⁻¹)	0.863	Máximo-mínimo de densidad electrónica residual (eÅ ⁻³)	0.453 y -0.550
$F(000)$	548		
Tamaño del cristal (mm)	0.214 x 0.136 x 0.110	Color	verde / prisma

Tabla 5.1. Parametrós cristalográficos del complejo 3

Enlace	Distancia (Å)	Átomos	Ángulo (°)
Ru-C13	1.959	C13-Ru-N3	88.01
Ru-N3	2.026	C13-Ru-N2	93.50
Ru-N2	2.031	N3-Ru-N2	178.16
Ru-N1	2.050	C13-Ru-N1	92.17
Ru-N7	2.074	C13-Ru-N7	96.40
Ru-C1	2.084	C13-Ru-C1	174.68
C13-O	1.123	C1-Ru-N2	89.47

Tabla 5.2. Distancias y ángulos de enlace alrededor del centro metálico del complejo 3 obtenidos a partir de la difracción de rayos X.

En la figura 5.3 podemos observar que el CO sustituye al ligante acentonitrilo del complejo 2 que se encuentra en posición *trans* al enlace organometálico. Esto se debe a la influencia *trans* que ejerce el enlace σ -C-M sobre el acetonitrilo haciéndolo más lábil en comparación con los otros 3 ligantes acetonitrilos.^{7,8} El complejo 3, a diferencia de su precursor, es

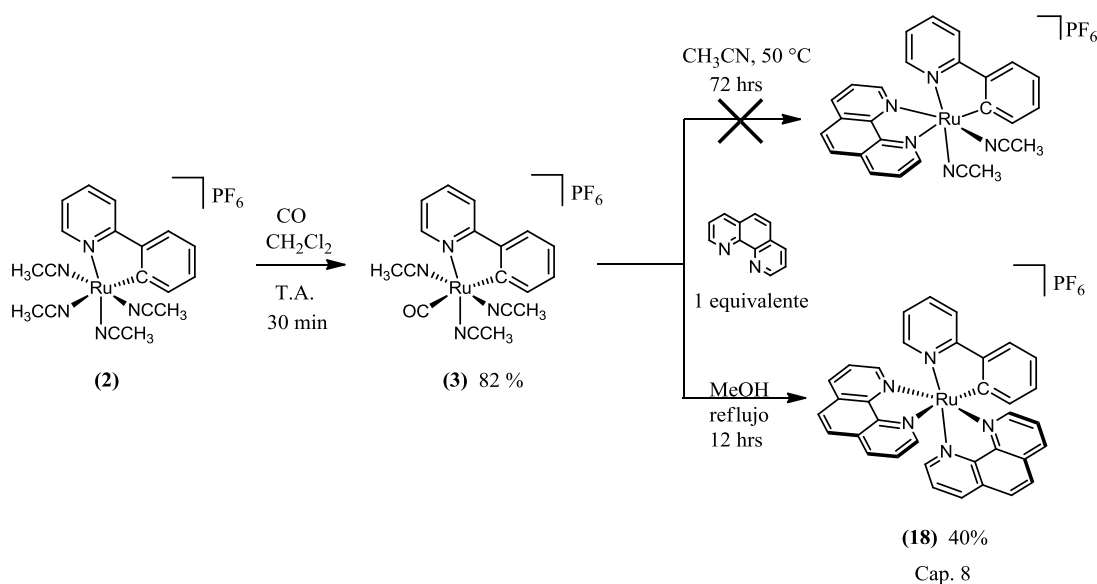
estable al aire en sólido y en disolución, y por lo planteado anteriormente el complejo tiene potencial para hacer una reacción de sustitución de ligantes más controlada.

Explorando la reactividad del complejo **3** se realizaron reacciones con un equivalente de 1,10-fenantrolina y 2,2'-bipiridina en CH₃CN, acetona y MeOH.

A través de estas reacciones se buscaba llevar a cabo la descoordinación del CO, generando un sitio vacante en el complejo que permitiera la coordinación de un *N*-piridínico de la fenantrolina, y promover así, la sustitución de un segundo ligante monodentado a través de la quelatación del ligante bidentado.

Cuando la reacción se realizó a 50 °C se recuperó cuantitativamente el complejo **3** por lo que no se produce la descoordinación del CO en estas condiciones.

Haciendo la reacción a reflujo de metanol por 8 horas, se obtuvo un producto purpura que correspondió al complejo [Ru(phpy)(phen)₂](PF₆) informado en la literatura,⁷ con un rendimiento de la reacción de 40 %. Bajo estas condiciones se produce la descoordinación no solo del CO sino de todos los ligantes monodentados del complejo **3** por lo cual se lleva a cabo la sustitución de los 4 ligantes monodentados, pero también existe un porcentaje de descomposición del complejo.



Esquema 5.2. Síntesis y reactividad del complejo **3**

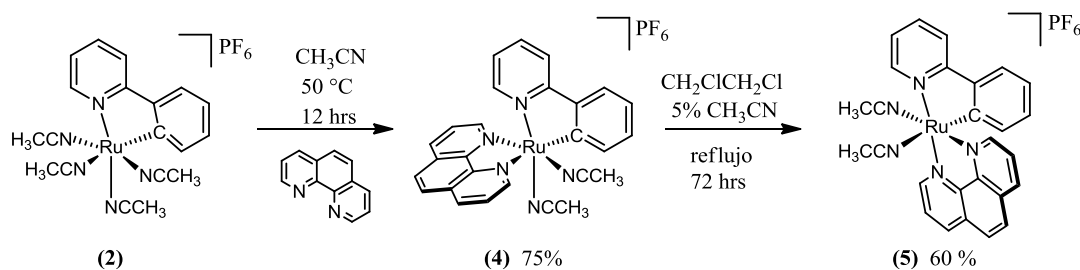
5.1.4. *cis*-[Ru(phpy)(phen)(CH₃CN)₂](PF₆) (4)

Fue sintetizado como se informa en la literatura,⁹ este complejo también contiene el metalociclo y 2 ligantes CH₃CN que pueden ser sustituidos. En este complejo el enlace C-Ru se encuentra en posición *cis* a ambos acetonitrilos por lo que ninguno de ellos se labiliza por efecto *trans* del enlace C-Ru como ocurre con el complejo 2.³

En el complejo 4 se puede llevar a cabo la sustitución de los acetonitrilos por un ligante bidentado en condiciones de reflujo de MeOH, sin embargo, el compuesto resultante se produce mediante una isomerización del complejo 4, es decir, el nuevo ligante bidentado no se sustituyó en las posiciones donde estaban los ligantes monodentados. Este resultado fue descubierto utilizando fenantrolinas sustituidas (ver esquema 5.8, anexo A2).⁸

5.1.5. *trans*-[Ru(phpy)(phen)(CH₃CN)₂](PF₆) (5)

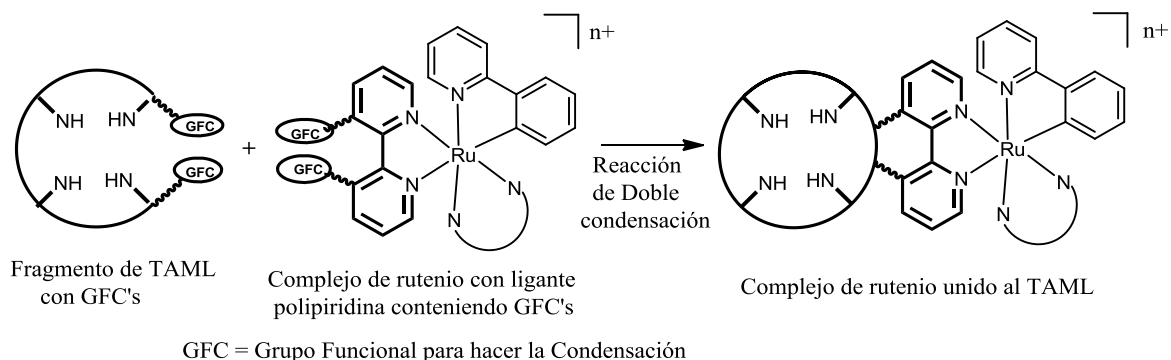
Fue sintetizado a partir de 4 como se informó en publicaciones recientes.^{7,8} Esta especie es un isómero del complejo 4 en el cual un acetonitrilo se encuentra en posición *trans* al enlace organometálico. Debido a la influencia *trans*, este CH₃CN es más lábil y el complejo 5 es más reactivo hacia la sustitución de ligantes que su precursor. En el espectro de RMN ¹H podemos observar que las señales en la parte aromática se ven modificadas y existe un desplazamiento de las señales alifáticas (con respecto al complejo 4) que aparecen en 2.00 y 2.20 ppm. En el espectro de infrarrojo se observa un ligero desplazamiento en la banda (νCN) a 2258 cm⁻¹. En el mismo trabajo se informa sobre la síntesis de otras especies mediante la sustitución de ligantes polipiridínicos sobre el complejo 5. Este compuesto se convirtió en la mejor opción para coordinar el TAML modificado mediante la sustitución de ligantes. (anexo A3)



Esquema 5.3. Síntesis de los complejos 4 y 5

5.2. Segunda propuesta: complejos conteniendo grupos para ser condensados.

La segunda propuesta consistió en sintetizar un rutenaciclo saturado con ligantes de polipiridina, en el cual uno de ellos incluya dentro de su estructura grupos funcionales como ácidos carboxílicos o aminas que permitan la formación del ligante sobre el complejo mediante una reacción de condensación.

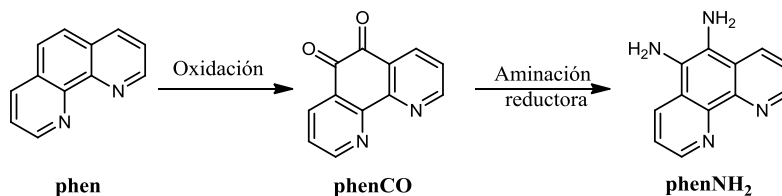


Esquema 5.4. Segunda propuesta para sintetizar el rutenaciclo unido al TAML

5.2.1. Ligantes polipiridínicos con grupos funcionales.

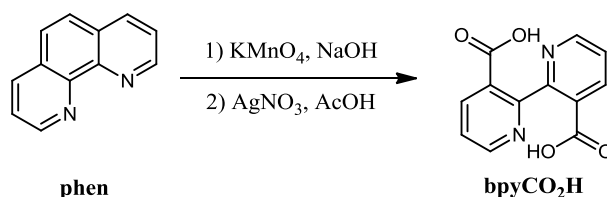
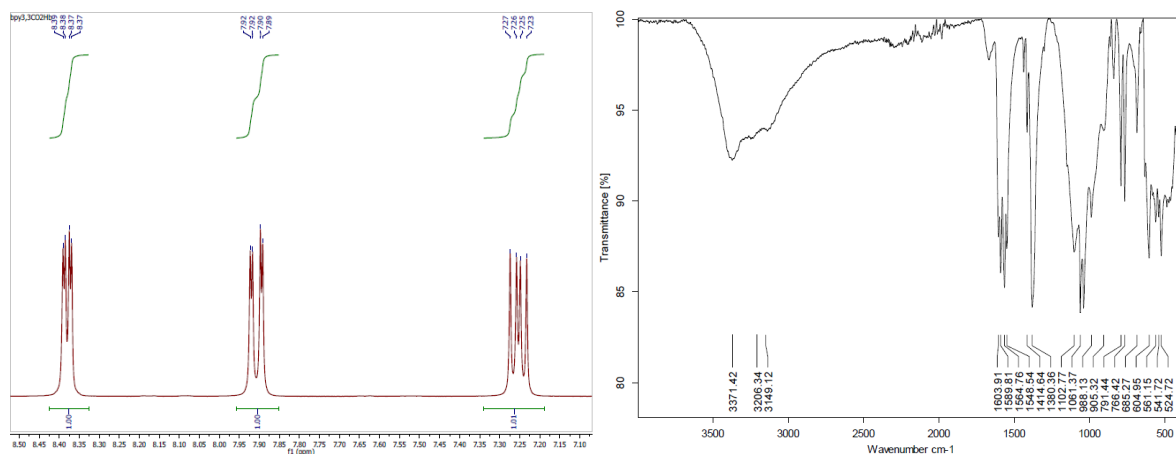
Para utilizar esta vía de síntesis fue necesario sintetizar ligantes polipiridínicos que contuvieran grupos funcionales (específicamente ácidos carboxílicos o aminas) sobre los cuales se pudiera llevar a cabo reacciones de condensación. Estos ligantes deberían ser coordinados al complejo de rutenio a través de los ligantes *N*-piridínicos, y posteriormente se formaría el TAML mediante las reacciones de condensación sobre los grupos sustituyentes. Los ligantes utilizados con este propósito fueron:

- a) 5,6-diamin-1,10-fenantrolina **phenNH₂**. Sintetizada como se describe en la literatura mediante 2 reacciones: la oxidación de las posiciones 5 y 6 de la 1,10-fenantrolina por refujo de mezcla sulfonítrica, para obtener la fenantrolin-5,6-diona **phenCO** y la posterior aminación reductora de esta especie.¹⁰ Los productos se caracterizaron por RMN ¹H y espectroscopía infrarroja.



Esquema 5.5. Síntesis de phenNH₂

- b) Ácido-3,3'-dicarboxi-2,2'-bipiridínico **bpyCO₂H**. Sintetizado como se informa en la literatura,¹⁰ a través de la oxidación de la 1,10-fenantrolina con KMnO₄ en condiciones básicas, y en segundo lugar con AgNO₃ en condiciones ácidas para promover la ruptura del anillo aromático interanular. El producto fue caracterizado por RMN ¹H donde se observan 3 señales de los hidrógenos aromáticos en 8.4, 7.9 y 7.5 ppm. En su espectro de IR se observan las bandas correspondientes a los ácidos carboxílicos en 1605 cm⁻¹ (νCO) y en 3370 cm⁻¹ (νOH).¹¹

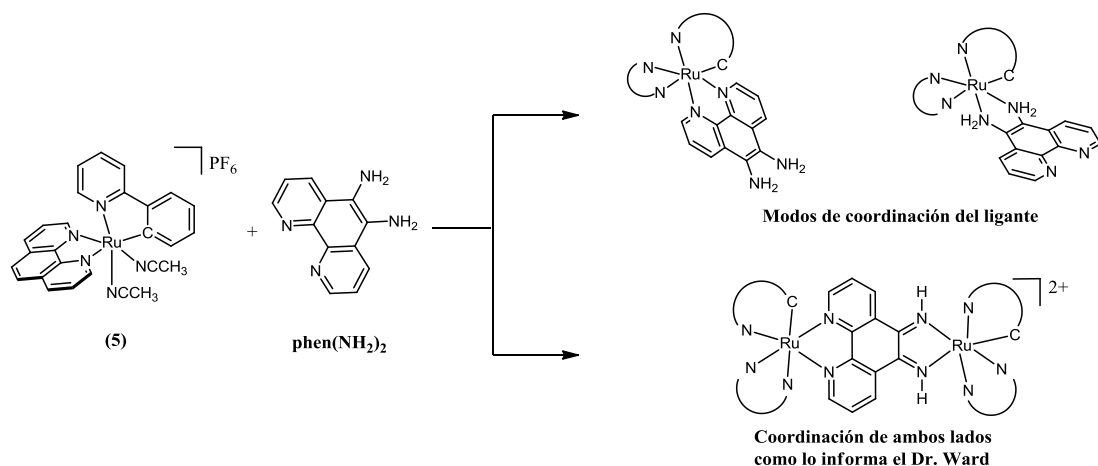
Esquema 5.6. Síntesis del bpyCO₂HFigura 5.4. Espectros de RMN ¹H en CD₃OD (izquierda) e IR en sólido (derecha) de BpyCO₂H

5.2.2. Complejo [Ru(phpy)(phen)(phenNH₂)]⁺

Como primera opción se buscó la obtención del complejo [Ru(phpy)(phen)(phenNH₂)]⁺ que contenga el ligante **phenNH₂** coordinado al rutenio por las *N*-piridinas y los grupos amina libres.

Para sintetizar este complejo se propuso la reacción entre el complejo **5** y el ligante **phenNH₂**. Estos ensayos se llevaron a cabo a diferentes temperaturas, tanto en metanol como acetona y en mezclas de acetonitrilo/metanol. Sin embargo, debido a que el ligante **phenNH₂** puede coordinarse al metal, no solo a través de las *N*-piridinas sino también por

los nitrógenos de los grupos amina. Bajo condiciones de reacción muy similares, el Dr. Ward informó la formación de un complejo bimetalúco de rutenio utilizando como puente la phenNH₂, donde las aminas se oxidaron y finalmente se coordinaron como una diimina, además la reacción dio lugar a varios diastereoisómeros.¹² En nuestro caso se obtuvo una mezcla de compuestos en donde no fue posible aislar ningún producto, y en el espectro de infrarrojo de la mezcla no se observan las bandas finas alrededor de 3300 cm⁻¹ debidas a las aminas libres, por lo que se piensa que en su mayoría se encuentran coordinadas en forma de iminas como lo informado en la literatura.¹¹



Esquema 5.7. Primera propuesta para sintetizar el complejo [Ru(phpy)(phen)(phenNH₂)]

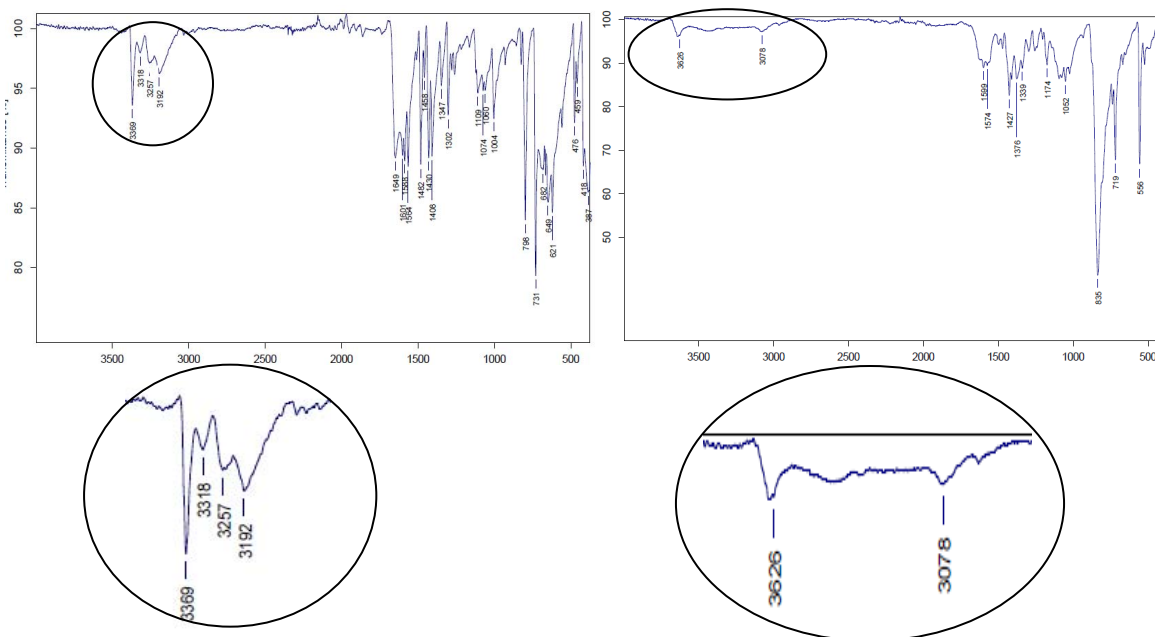


Figura 5.5. Espectros de IR del compuesto phenNH₂ (izquierda) y de la mezcla de productos de la reacción entre **5** y phenNH₂ (derecha)

Posteriormente, se planteó una segunda posibilidad para la obtener el complejo $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{phen})(\text{phenNH}_2)]^+$ esto a través de la aminación reductora del precursor $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{phen})(\text{phenCO})]\text{PF}_6$ (**7**).¹⁰

La síntesis de **7** se intentó en una primera instancia con la reacción entre el complejo **4** y un equivalente de **phenCO**. Sin embargo en la **phenCO** por efecto de los grupos electroattractores, los pares de electrones de los *N*-piridínicos no son los suficientemente coordinantes para llevar a cabo esta reacción, por lo que se recuperó el 70 % de **4**.

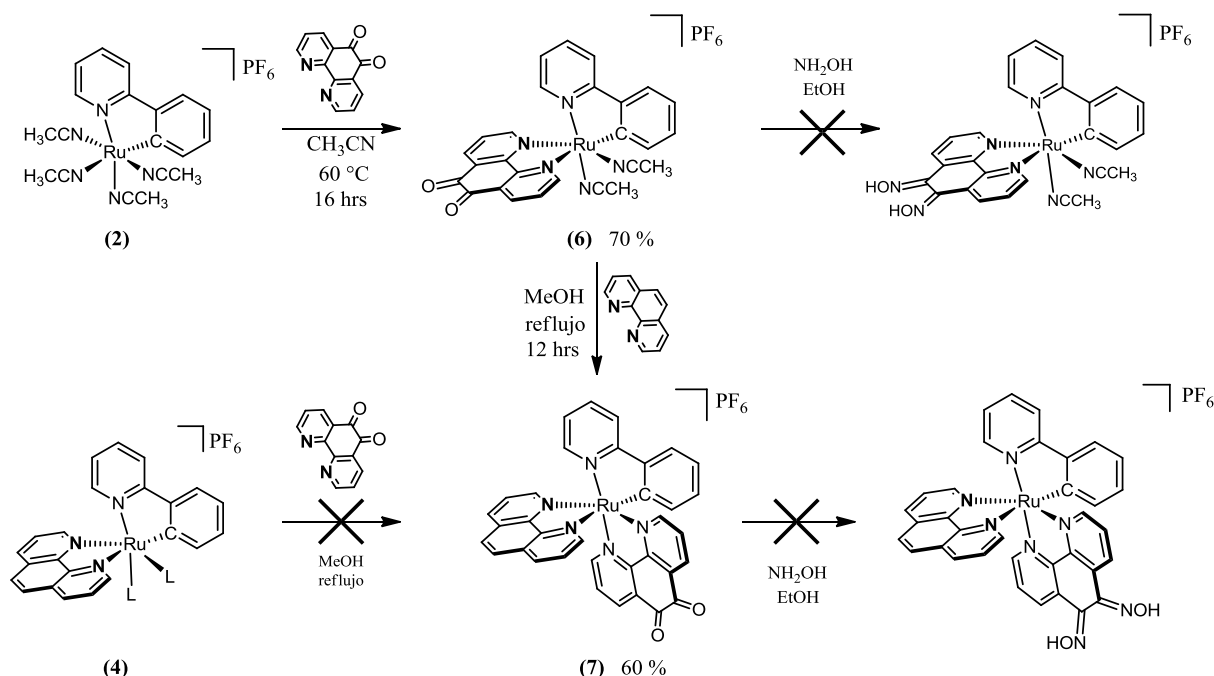
5.2.3. *cis*- $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{phenCO})(\text{CH}_3\text{CN})_2]\text{PF}_6$ (**6**)

Alternativamente, para la obtención de **7**, se propuso coordinar la **phenCO** sobre el complejo **2**, utilizando el mismo procedimiento para la síntesis de **4**. De esta forma fue posible aislar y caracterizar el compuesto **6**. En el espectro de RMN ^1H se observan en la zona aromática señales que integran para los 14 H aromáticos del complejo y a 2.41 ppm y 2.45 ppm aparecen las señales asignadas a los CH_3CN . En el espectro de infrarrojo se puede ver una banda en 1691 cm^{-1} correspondiente a la vibración (νCO) de la dicetona y otra pequeña en 2266 cm^{-1} de (νCN). (anexo A4)

5.2.4. *trans*- $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{phen})(\text{phenCO})]\text{PF}_6$ (**7**)

Finalmente, la especie **7** se sintetizó a partir de la reacción entre el complejo **6** y un equivalente de 1,10-fenantrolina a reflujo de metanol. En su espectro de RMN ^1H podemos observar en la zona de aromáticos señales que integran para 22 H y la desaparición de las señales alifáticas. En el espectro de infrarrojo se conserva la banda de la dicetona en 1687 cm^{-1} de la vibración (νCO) y se pierde la vibración (νCN). La estereoquímica de los productos está basada en los espectros de RMN ^1H al compararlos con los resultados informados en la literatura.⁸ (anexo A5)

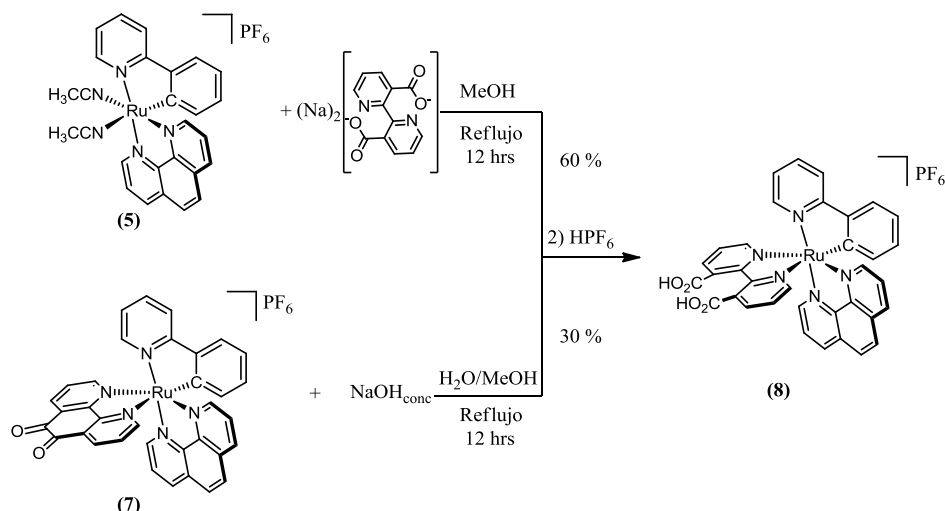
Una vez obtenido **7**, se intentó llevar a cabo la aminación reductora sobre los grupos cetónicos del ligante **phenCO**, basados en lo informado en la literatura.¹⁰ Sin embargo, las condiciones de reacción produjeron la descomposición del complejo.

Esquema 5.8. Vías de síntesis para la obtención del complejo [Ru(phpy)(phen)(phenNH₂)]⁺

5.2.5. [Ru(phpy)(phen)(bpyCO₂H)]PF₆ (8)

Como segunda opción se planteó sintetizar el complejo [Ru(phpy)(phen)(bpyCO₂H)]⁺, el cual contiene el ligante bpyCO₂H coordinado al rutenio por los *N*-piridínicos dejando los grupos carboxílicos libres para su posterior condensación.

El complejo **8** fue sintetizado a partir de la reacción entre el complejo **6** con un equivalente del 2,2'-bipiridin-3,3'-dicarboxilato de sodio siguiendo en método informado en la literatura.¹¹ En el espectro de RMN ¹H en la zona de aromáticos se observan las señales que integran para 22 H y no hay ninguna señal en zona alifática. En el espectro de masas se observa un pico en 680 *m/z* correspondiente al ion molecular [M]⁺ y en el espectro de infrarrojo es posible ver las bandas de los grupos carboxílicos en 3317 cm⁻¹ (νOH) y 1610 cm⁻¹ (νCO). Fue posible obtener el mismo producto a través de la oxidación de la dicetona del complejo **7** utilizando una disolución de NaOH 2M en metanol/agua 1:1 a reflujo. Sin embargo, el rendimiento obtenido mediante esta vía fue mucho menor y la purificación resultó más complicada (anexo A6).



Esquema 5.9. Síntesis del complejo 8

5.3. Parte experimental

Materiales y métodos

Todas las reacciones fueron realizadas bajo atmósfera inerte, en una línea doble de vacío-nitrógeno utilizando técnicas de Schlenk. Se usaron disolventes anhidros previamente destilados con su respectivo agente secante: diclorometano (P_2O_5), CH_3CN (P_2O_5), THF (Na°), alcoholes (Mg°), Et_3N ($NaOH$ y malla molecular de 4Å). Todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Co. excepto el $RuCl_3$ que fue adquirido de Pressure Chemicals, los disolventes fueron obtenidos de Fermont grado HPLC.

Los espectros de RMN 1H y ^{13}C fueron obtenidos en un equipo Bruker Advance 300, los desplazamientos químicos son reportados en ppm empleando como disolventes CD_3CN , CD_3OD , $DMSO-d_6$. La referencia para cada espectro fue el mismo disolvente deuterado, las constantes de acoplamiento se reportan en Hz. Los espectros de masas se obtuvieron utilizando un espectrómetro de masas Bruker Esquire por electrospray (ESI) y un espectrómetro JMS-700 para bombardeo de átomos rápido (FAB) en matriz de nitrobenzeno. Los espectros de infrarrojo fueron tomados en un equipo Bruker Alfa-P en sólido, por la técnica de reflectancia difusa (ATR). Los análisis elementales se hicieron en un analizador elemental Perkin Elmer 2400 para C, H, N y S. La difracción de rayos X se realizó en un difractómetro Bruker Smart Apex equipado con radiación de Mo° ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) con detector bidimensional CCD por la técnica de monocristal.

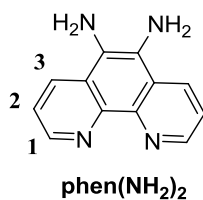
Síntesis de 5,6-diamin-1,10-fenantrolina. (phenNH₂).

La síntesis de este compuesto se llevó a cabo siguiendo el método reportado por S. Bodige y F. M. MacDonnell.¹⁰ En un matraz enfriado a 0 °C, se agregaron 14 mL de H₂SO₄ concentrado, 1.0 g (5.5 mmol) de 1,10-fenantrolina y 1.73 g (17 mmol) de NaBr. La mezcla se agitó 10 minutos y se adicionaron gota a gota 7 mL de HNO₃ concentrado. La mezcla de reacción se calentó a reflujo por 1 hora. Una disolución acuosa de NaOH 30 % se adicionó a la disolución enfriada a 0 °C, hasta obtener un pH = 6. Se formó un precipitado amarillo, el cual se filtró al vacío a través de vidrio poroso. El sólido obtenido se disolvió en 120 mL de agua caliente y la disolución se filtró en caliente con papel filtro. El producto se extrajo del filtrado con 60 mL de CH₃Cl. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y el disolvente se evaporó al vacío. El sólido amarillo resultante se secó al vacío y se obtuvieron 815 mg (3.8 mmol) de 1,10-fenantrolin-5,6-diona. (Rendimiento 70%).

Todo el producto anterior se puso a reaccionar con 560 mg (8.0 mmol) de NH₂OH·HCl, 790 mg (4.0 mmol) de BaCO₃, en 60 mL de etanol. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 16 horas. Se evaporó el disolvente al vacío y el sólido resultante se disolvió en 85 mL de HCl 0.2 M y se agitó por 2 horas a temperatura ambiente, hasta la formación de un precipitado blanco. La suspensión se filtró al vacío a través de vidrio poroso y el sólido se secó al vacío a 80 °C, durante 12 horas. Se obtuvieron 470 mg (2.0 mmol) de 1,10-fenantrolin-5,6-dionadioxima. (Rendimiento 50%).

Todo el producto anterior se mezcló en un matraz con 500 mg de Pd/C al 10 % y 150 mL de etanol. La mezcla de reacción se calentó a reflujo, se agregó gota a gota una disolución de 4.5 mL de N₂H₄ en 20 mL y el reflujo se mantuvo por 12 horas. La mezcla se filtró en caliente a través de celita y el disolvente se evaporó al vacío. El producto resultante se purificó por cristalización en agua, obteniéndose cristales amarillos que se filtraron a través de vidrio poroso y secaron al vacío por 24 horas. Se obtuvieron 300 mg (1.4 mmol, rendimiento 72%).

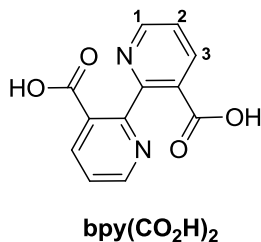
¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 8.92 (*dd*, 2H, ²*J* = 7.2, ³*J* = 4.2, **H2**), 7.86 (*dd*, 2 H, ²*J* = 6.3, ³*J* = 3.6, **H1**), 7.22 (*dd*, 2 H, ²*J* = 7.2, ²*J* = 6.3, **H3**). IR (cm⁻¹): 3369, 3314, 3253, 3186 (NH), 1647, 1601 (N=C, Ar), 1482, 1430, 1408 (Ar)



Síntesis del ácido 3,3'- dicarboxibipiridínico (Bpy(CO₂H)₂).

La síntesis se llevó a cabo como se describe en el procedimiento informado por G. F. Smith y F. P. Richter.¹¹ En un matraz se mezclaron 2.0 g (11 mmol) de 1,10-fenantrolina, 890 mg (22 mmol) de NaOH y 200 mL de agua, se agitó durante 20 minutos y lentamente se agregaron 3.5 g (22 mmol) de cristales de KMnO₄. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 12 horas. La disolución se filtró en caliente con papel filtro y se concentró a la mitad del volumen. Se adicionó ácido acético gota a gota hasta obtener un pH = 5. Una disolución de 3.4 g de AgNO₃ en 5 mL de agua se adicionó a la mezcla de reacción y se agitó durante 30 minutos. Se formó un precipitado blanco, el cual se filtró al vacío sobre vidrio poroso. El sólido se suspendió en 125 mL de agua caliente y se burbujeó H₂S (producido con la reacción de Na₂S y HCl) hasta la formación de Ag⁰ negra. La mezcla de reacción se filtró en caliente con carbón activado. El filtrado se concentró a un volumen de 5 mL y se enfrió hasta obtener cristales. Los cristales se filtraron al vacío y secaron al vacío, se obtuvieron 1.3 g (5.3 mmol) del producto. (Rendimiento 48 %).

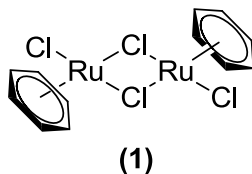
¹H RMN (CD₃OD) δ : 8.60 (*d*, 1 H, ²*J* = 4.8, **H1**), 8.40 (*d*, 2 H, ²*J* = 7.9, **H3**), 7.51 (*dd*, 2 H, ²*J* = 7.9, ²*J* = 4.8, **H2**). IR (cm⁻¹): 2886 (NH)⁺, 1710 (CO).



Síntesis de [Ru(C₆H₆)Cl₂]₂ (1).

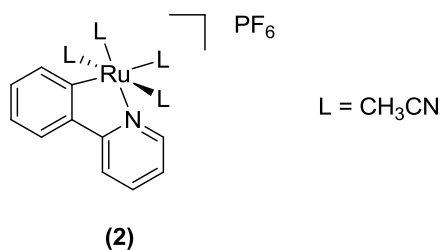
Se realizó como se describe en la literatura.⁵ En un matraz se disolvieron 5.0 g de RuCl₃·xH₂O en una mezcla etanol/agua (95:5) y se agregaron 25 mL de 1,4-ciclohexadieno. La mezcla se calentó a 45 °C durante 6 horas. Se observó un precipitado rojo, el cual fue

filtrado al vacío y lavado con etanol frío. Se obtuvieron 4.37 g del producto. (Rendimiento de 70 %).



Síntesis de hexafluorofosfato de tetrakis acetonitrilo 2-(2-piridinil-κN)-fenil-κ-C rutenio [Ru(phpy)(CH₃CN)₄]PF₆ (2).

Se preparó siguiendo el método informado.³ Una mezcla de 1.0 g (2 mmol) de **1**, 160 mg (4 mmol) de NaOH, 600 mg (4 mmol) de KPF₆, 0.65 mL (4 mmol) de 2-fenilpiridina y 50 mL de CH₃CN se calentó a 45 °C, durante 16 horas. La mezcla de reacción se filtró en papel filtro y a la disolución obtenida se le evaporó el disolvente a sequedad. El sólido resultante se lavó con éter etílico y el producto fue purificado por cromatografía en columna de alúmina, utilizando una mezcla CH₂Cl₂/CH₃CN 85:15. Se eluyó una fracción amarilla. El producto se cristalizó por difusión en CH₂Cl₂/éter. Se obtuvieron 1.5 g (26 mmol). (Rendimiento 66 %).

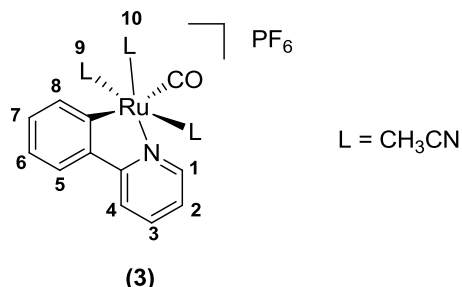


Síntesis de hexafluorofosfato de tris acetonitrilo carbonil 2-(2-piridinil-κN)-fenil-κ-C rutenio [Ru(phpy)(CH₃CN)₃(CO)]PF₆ (3)

Una disolución de 300 mg (0.5 mmol) de **2** en 20 mL de CH₂Cl₂, fue burbujada por 30 minutos con CO a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó al vacío y la mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de alúmina, utilizando CH₂Cl₂ se eluyó una fracción incolora, el producto se cristalizó por difusión lenta de CH₂Cl₂/éter. Se obtuvieron 240 mg (0.4 mmol). (Rendimiento 82 %).

¹H NMR (CD₃CN) δ: 8.80 (*ddd*, 1 H, ²*J* = 5.7, ³*J* = 1.6, ⁴*J* = 0.8, **H1**), 8.00 (*ddd*, 1 H, ²*J* = 7.3, ³*J* = 1.2, ⁴*J* = 0.5, **H6**), 7.85 (*ddd*, 1 H, ²*J* = 8.0, ³*J* = 1.3, ⁴*J* = 0.5, **H7**), 7.77 (*ddd*, 1 H, ²*J* = 7.7, ³*J* = 1.5, ⁴*J* = 0.8, **H4**), 7.75 (*ddd*, 1 H, ²*J* = 7.7, ²*J* = 7.3, ³*J* = 1.6, **H3**), 8.38 (*ddd*,

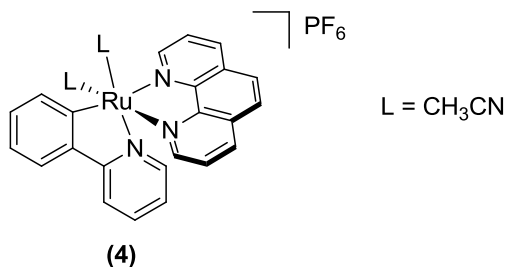
1 H, $^2J = 7.3$, $^2J = 7.3$, $^3J = 1.3$, **H5**), 7.23 (*ddd*, 1 H, $^2J = 7.8$, $^2J = 7.3$, $^3J = 1.2$, **H8**), 7.08 (*ddd*, 1 H, $^2J = 7.3$, $^2J = 5.7$, $^3J = 1.5$, **H2**), 2.61 (*s*, 3 H, **H6**), 2.12 (*s*, 6H). IR (cm^{-1}): 2291 (CN), 1989 (CO), 834 (PF_6). FAB $^+$: $[\text{M}]^+ = 407\text{ m/z}$, $[\text{M-CO}]^+ = 379\text{ m/z}$, $[\text{M-CO-CH}_3\text{CN}]^+ = 338\text{ m/z}$, $[\text{M-CO-2CH}_3\text{CN}]^+ = 297\text{ m/z}$ y $[\text{M-CO-3CH}_3\text{CN}]^+ = 256\text{ m/z}$.



Síntesis de hexafluorofosfato de *cis*-bis-acetonitrilo 1,10-fenantrolin- κN - κN 2-(2-piridinil- κN)-fenil- κC rutenio *cis*-[Ru(phpy)(phen)(CH₃CN)₂]PF₆ (4).

Se obtuvo siguiendo el método informado en la literatura.⁹ Una mezcla de 565 mg (1.0 mmol) de **2**, 180 mg (1.0 mmol) de 1,10-fenantrolina y 30 mL de metanol se calentó a reflujo durante 12 horas. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo fue purificado por cromatografía en columna de alúmina, con una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$ 85:15. Se eluyó una fracción roja, el producto se cristalizó por difusión lenta de CH_2Cl_2 /éter. Se obtuvieron 500 mg. (Rendimiento 75 %).

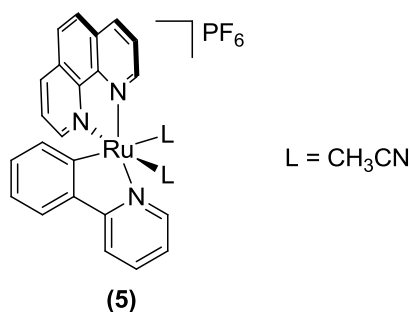
^1H NMR (CD_3CN) δ : 9.75 (*dd*, 1 H, $^2J = 5.0$, $^3J = 1.4$), 8.77 (*dd*, 1 H, $^2J = 8.3$, $^3J = 1.5$), 8.34 (*dd*, 1 H, $^2J = 7.5$, $^3J = 1.3$), 8.27-8.17 (*m*, 4 H), 8.06 (*d*, 1 H, $^2J = 8.8$), 7.90 (*t*, 1 H, $^2J = 8.0$), 7.51 (*td*, 1 H, $^2J = 7.3$, $^3J = 1.6$), 7.43-7.36 (*m*, 3 H), 7.33 (*td*, 1 H, $^2J = 7.4$, $^3J = 1.3$), 7.14 (*td*, 1 H, $^2J = 7.6$, $^3J = 1.3$), 6.61 (*td*, 1 H, $^2J = 5.7$, $^2J = 1.4$), 2.32 (*s*, 3 H), 2.10 (*s*, 3H) IR: (cm^{-1}): 2262 (CN), 825 (PF_6).



Síntesis de hexafluorofosfato de *trans*-bis-acetonitrilo 1,10-fenantrolin- κN - κN 2-(2-piridinil- κN)-fenil- κC rutenio *trans*-[Ru(phpy)(phen)(CH₃CN)₂]PF₆ (5**).**

Se sintetizó como se informa en la literatura.^{7,8} Una disolución de 300 mg (0.45 mmol) de **4** en 30 mL de una mezcla 95:5 de CH₂Cl-CH₂Cl/CH₃CN se calentó a reflujo durante 72 horas. El disolvente fue evaporado al vacío y el residuo se disolvió en una mezcla de CH₂Cl₂/CH₃CN 9:1 y se purificó por cromatografía en columna de alúmina. Con la misma mezcla de disolventes se eluyó una fracción púrpura, el disolvente se evaporó a sequedad y el producto se lavó con el éter y se secó al vacío. Se obtuvieron 180 mg (0.27 mmol). (Rendimiento 60 %).

¹H NMR (CD₃CN) δ : 9.52 (*dd*, 1 H, ²*J* = 5.2, ³*J* = 1.2), 8.77 (*dd*, 1 H, ²*J* = 5.1, ³*J* = 1.5), 8.47 (*dd*, 1 H, ²*J* = 8.2, ³*J* = 1.3), 8.14 (*dd*, 1 H, ²*J* = 8.2, ³*J* = 1.2), 8.00 (*d*, 1 H, ²*J* = 8.2), 7.93 (*d*, 1 H, ²*J* = 8.2) 7.95-7.75 (*m*, 4 H), 7.60 (*d*, 1 H, ²*J* = 7.8), 7.30 (*td*, 1 H, ²*J* = 5.5, ³*J* = 2.0), 6.59 (*td*, 1 H, ²*J* = 7.7, ²*J* = 1.3), 6.38 (*td*, 1 H, ²*J* = 7.4, ³*J* = 1.4, H₈), 5.93 (*d*, 1 H, ²*J* = 7.5), 2.20 (*s*, 3 H), 2.00 (*s*, 3H). IR(cm⁻¹): 2258 (CN), 826 (PF₆).

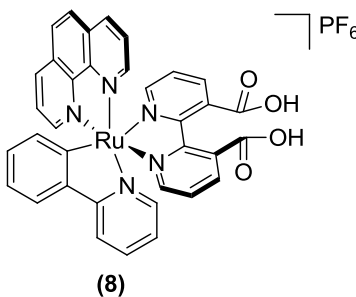


Síntesis de hexafluorofosfato de (3,3'-dicarboxi)-2,2'-bipiridin- κN - κN 1,10-fenantrolin- κN - κN 2-(2-piridinil- κN)-fenil- κC rutenio [Ru(phpy)(phen)(bpyCO₂H)]PF₆ (8**).**

Se sintetizó basándonos en lo informado en la literatura.⁸ A una mezcla de 40 mg (1.6 mmol) de bpy(CO₂H)₂, 13 mg (3.2 mmol) de NaOH en 10 mL de una mezcla MeOH/H₂O 8:2, se adicionaron 100 mg (1.5 mmol) de **5** y se calentó a reflujo durante 12 horas. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo se disolvió en agua y se filtró a través de celita. Se obtuvo una disolución púrpura a la cual se le agregó gota a gota HPF₆ 0.2 M en agua, hasta observar la formación de un precipitado púrpura. El sólido fue recolectado por filtración al vacío en un embudo Büchner a través de papel filtro, se lavó con agua y se secó al vacío. Se obtuvieron 75 mg (0.9 mmol) de producto. (Rendimiento 60 %).

^1H NMR (CD_3OD) δ : 8.38 (*s*, 1 H), 8.22 (*d*, 1 H, $^2J = 8.1$), 8.12 (*d*, 1 H, $^2J = 7.8$), 7.96-7.86 (*m*, 8 H), 7.75 (*d*, 1 H, $^2J = 7.8$), 7.62 (*t*, 1 H, $^2J = 7.7$) 7.49-7.36 (*m*, 3 H), 6.94-6.85 (*m*, 3H), 6.65 (*t*, 1 H, $^2J = 7.4$), 6.45 (*td*, 1 H, $^2J = 7.3$), 5.95 (*d*, 1 H, $^2J = 7.3$).

IR (cm^{-1}): 1728 (CO), 1613 (CO), 823 (PF_6). (Anexo 1, RMN ^1H , IR)



5.4.Referencias.

1. Fernandez, S.; Pfeffer, M.; Ritleng, V.; Sirlin, C. *Organometallics* **1999**, *18*, 2390.
2. Le Lagadec, R.; Alexandrova, L.; Estevez, H.; Pfeffer, M.; Laurinavičius, V.; Razumiene, J.; Ryabov, A. D. *J. Inorg. Chem.*, **2006**, 2735.
3. Ryabov, A. D.; Le Lagadec, R.; Estevez, H.; Toscano, R. A.; Hernandez, S.; Alexandrova, L.; Kurova, V. S.; Fischer, A.; Sirlin, C.; Pfeffer, M., *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 1626.
4. Ryabov, A. D.; Sukharev, V. S.; Alexandrova, L.; Le Lagadec, R.; Pfeffer, M. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6529.
5. Bennett, A. M., Huang, T. N., Matheson, T. W., Smith, A. K., *Inorg. Synt.* **1982**, *21*, 74.
6. Le Lagadec, R.; Rubio, L.; Alexandrova, L.; Toscano, R. A.; Ivanova, E. V.; Meškys, R.; Laurinavičius, V.; Pfeffer, M.; Ryabov, A. D. *J. Organomet. Chem.* **2004**, 689, 4820.
7. Boff, B.; Ali, M.; Alexandrova, L.; Espinosa-Jalapa, N. A.; Saavedra-Díaz, R. O.; Le Lagadec, R. *Organometallics*, **2013**, *32*, 5092.
8. Tu, Y-J.; Mazumder, S.; Endicott, J. F.; Turro, C.; Kodanko, J. J.; Schlegel, H. B. *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 8003.
9. Ryabov, A. D.; Sukharev, V. S.; Alexandrova, L.; Le Lagadec, R.; Pfeffer, M. *Inorg. Chem.* **2001**, *30*, 6529.

10. Bodige, S.; MacDonnell, F. M. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 8159
11. a) Smith, G. F.; Richter, F. P.; In *Phenanthroline and Substituted Phenanthroline Indicators*, **1944**, 20, The G. F. Smith Chemical, Columbus. b) Shan, B. Z.; Zhao, Q.; Goswami, N.; Eichhorn, D. M.; Rillema D. P. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, 211, 117.
12. Fletcher, N. C.; Robinson, T. C.; Behrendt, A.; Jeffery, J. C.; Reeves, Z. R.; Ward, M. *D. J. Chem Soc. Dalton Trans.* **1999**, 2999.

6. Ligante TetraAmido MacroCíclico (TAML) modificado

En este capítulo se aborda el diseño de un ligante tetraamido macrocíclico (TAML) modificado, así como las rutas sintéticas planteadas para prepararlo. La modificación sobre el ligante consiste en introducir un fragmento polipiridina en la parte externa de su estructura, con objeto de que funcione como quelato bidentado y permita coordinar el TAML a un metalociclo de rutenio por estas *N*-piridinas. Debido a que el TAML posee una cavidad interna que puede alojar un metal de la primera serie de transición; con el nuevo ligante se podrá formar un complejo bimetalico, donde un metal se encuentre enlazado a la cavidad del TAML y el segundo metal este coordinado a los anillos piridínicos.

6.1.TAML modificado con fenantrolina (phenTAML)

La primera propuesta para modificar el ligante se basó en sustituir el anillo aromático en la cabeza del TAML por un fragmento de 1,10-fenantrolina.

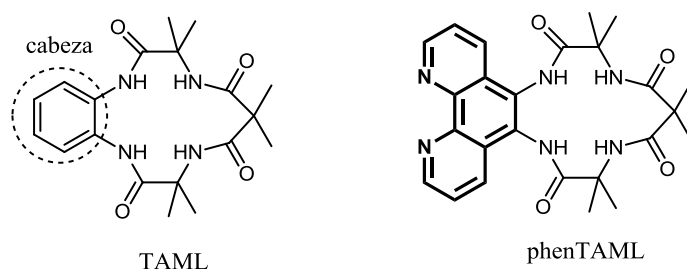
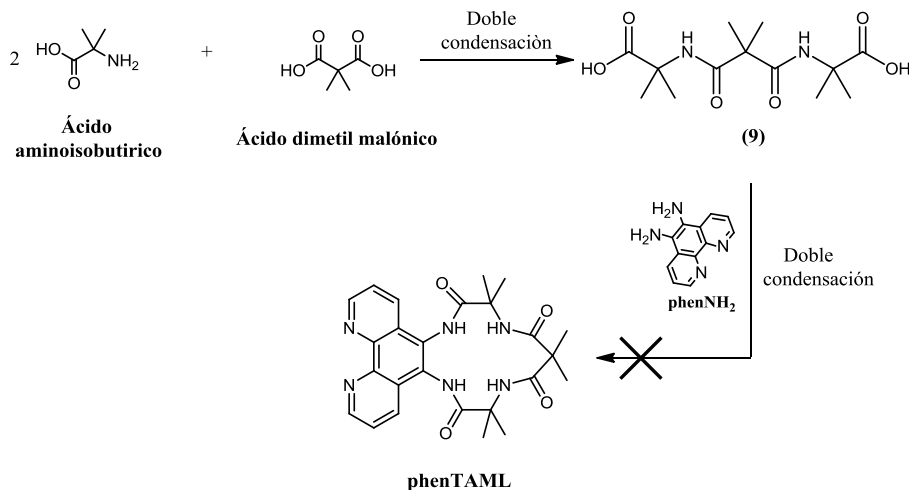


Figura 6.1. Primera propuesta de TAML modificado

En la estructura del phenTAML se observa la cavidad central rodeada de los 4 grupos amida, en donde se puede introducir un metal. Este esqueleto es prácticamente igual a los TAML's (ver figura 2.39) sintetizados previamente por el grupo del Dr. Collins.¹ Por otra parte el fragmento de fenantrolina es un quelato bidentado de estructura plana que tiene una alta capacidad donadora lo que resulta en un grupo idóneo para poder coordinar el segundo metal.

Para preparar los TAML's la ruta sintética más directa llamada "amidon" consiste en condensar 2 aminoácidos (por los grupos amino) con un diácido carboxílico. Esta reacción da como resultado la formación de la cola del TAML. El nuevo compuesto contiene 2 grupos amida y 2 ácidos carboxílicos (que formarán la cavidad central del ligante), sobre los cuales se lleva a cabo una doble condensación usando una diamina

que permite el cierre del macrociclo y la formación de la cabeza del ligante.² Basados en esta ruta, se propuso llevar a cabo una reacción de doble condensación entre la 5,6-diaminifenantrolina **phenNH₂** y el ácido 2,2-((2,2-dimetilmalonil)bis(azanedil))bis(2-metilpropanoico) **9**.



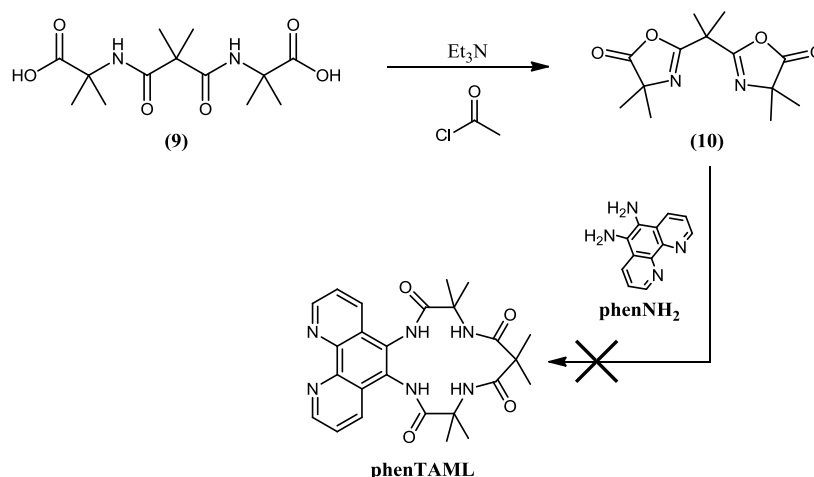
Esquema 6.1. Ruta amidon para sintetizar el ligante phenTAML a través del compuesto 9

La síntesis de la **phenNH₂** fue descrita previamente en el capítulo 5.

El compuesto **9** se sintetizó a partir de 2 equivalentes del ácido-2-aminoisobutírico y un equivalente de cloruro de dimetil malonilo (derivado del ácido dimetil malónico) como se reporta en la literatura.²

Para llevar a cabo la doble condensación entre el compuesto **9** y la **phenNH₂** se hicieron reacciones a diferentes tiempos y temperaturas de reacción. La solubilidad de ambos reactivos representó un grave problema, ya que son solubles únicamente en alcoholes, DMF y DMSO, por lo que la reacción fue probada en THF, CH₂Cl-CH₂Cl, DMF y DMSO (disolventes apróticos). Para producir el cloruro de acilo de **9** *in situ* que es más reactivo, se adicionaron agentes halogenantes como PCl₃, PCl₅ y SOCl₂ en combinación con bases como Et₃N, DMAP y Na₂CO₃ para neutralizar el HCl producido durante la reacción, sin embargo, bajo estas condiciones solo se recuperaron cuantitativamente los reactivos.

Bajo el mismo esquema, se propuso la condensación de la **phenNH₂** con la oxazolidinona **10** que corresponde a la deshidratación de compuesto **9**, producto de la condensación intramolecular.³



Esquema 6.2. Ruta amidon para sintetizar el ligante phenTAML mediante el compuesto 10.

En la síntesis de los TAML se han informado reacciones similares, sin embargo, las oxazolininas se forman *in situ*. En nuestro caso fue posible aislar y caracterizar el compuesto **10**. En el espectro de RMN ^1H se puede observar la desaparición de la señal de los hidrógenos de la amida en 7.5 ppm y en el espectro de IR desaparece la banda en 3300 cm^{-1} de la vibración (νOH) de los ácidos carboxílicos. El compuesto **10** es más reactivo para la reacción de condensación, incluso se han obtenido mejores resultados que a través de los cloruros de acilo.² Aislando la especie **10** se esperaba una reacción más limpia debido a que no se adicionan otros reactivos y no deberían obtenerse subproductos a diferencia de formarlo *in situ* donde se utilizan agentes halogenantes y bases. Sin embargo, para nuestro caso el compuesto **10** no fue suficientemente reactivo para llevar a cabo la reacción, recuperando nuevamente los reactivos.

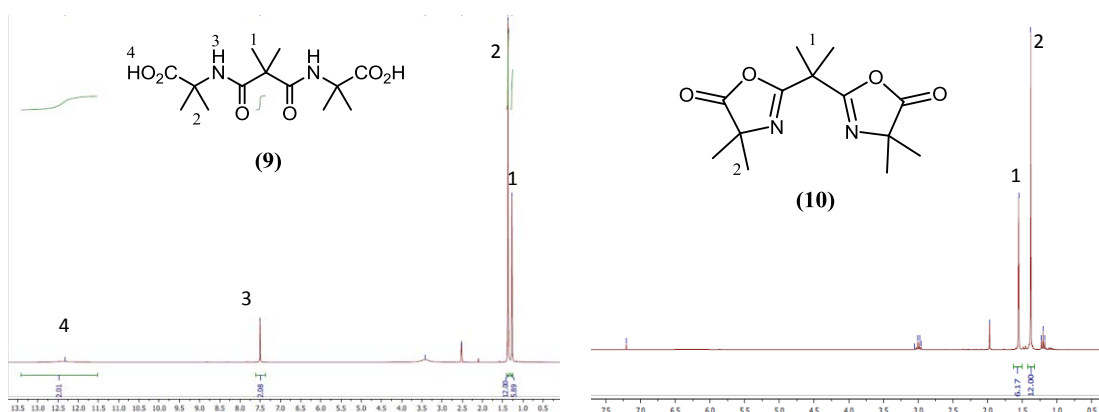
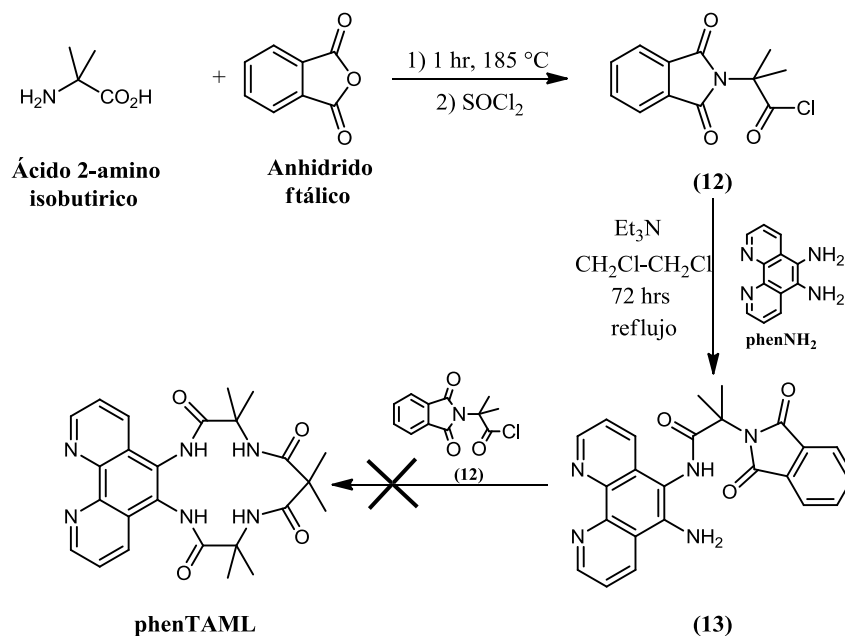


Figura 6.2. RMN ^1H de los compuestos 9 (derecha) y 10 (izquierda) en CD_3OD .

Se informa una segunda ruta sintética “diamina-diamida” para preparar los TAML’s, la cual se basa en una serie de 5 pasos: el primero implica la protección del grupo amino

de un aminoácido, lo que permite en segundo paso formar el cloruro de acilo (más reactivo) y en una tercera etapa llevar a cabo 2 reacciones de condensación entre el cloruro de acilo y una diamina, lo cual ensambla la cabeza del ligante. El cuarto paso consiste en la desprotección de los grupos amina para poder cerrar el macrociclo. El último paso consiste en unir la cola del ligante mediante una reacción de doble condensación sobre las aminas libres.⁴

Como última alternativa para obtener el **phenTAML** nos basamos en la ruta diamina-diamida para proponer la condensación de la **phenNH₂** con 2 equivalentes de cloruro de 2-ftalamidopropanoilo (**12**), que es el aminoácido protegido transformado en cloruro de acilo (obtenido en el segundo paso).⁴



Esquema 6.3. Ruta diamina-diamida para sintetizar el **phenTAML**

A través de esta ruta fue posible obtener el producto **13** correspondiente a la condensación entre la **phenNH₂** y **12** dando como resultado la formación de una amida. Este producto fue caracterizado por RMN ¹H y se determinó su estructura por difracción de rayos X. Sin embargo, no fue posible realizar la segunda condensación, aún con 2 equivalentes de **12** en la misma reacción. Tampoco a partir del compuesto **13** aislado, con otro equivalente de **12**. Sumado a la dificultad para disolver la **phenNH₂**, las aminas son poco nucleofílicas debido a la conjugación que existe con los anillos piridínicos que ejercen un fuerte efecto electroatractor, por lo cual no pueden llevar a

cabo la segunda condensación al menos en las condiciones en que se realizaron los experimentos.

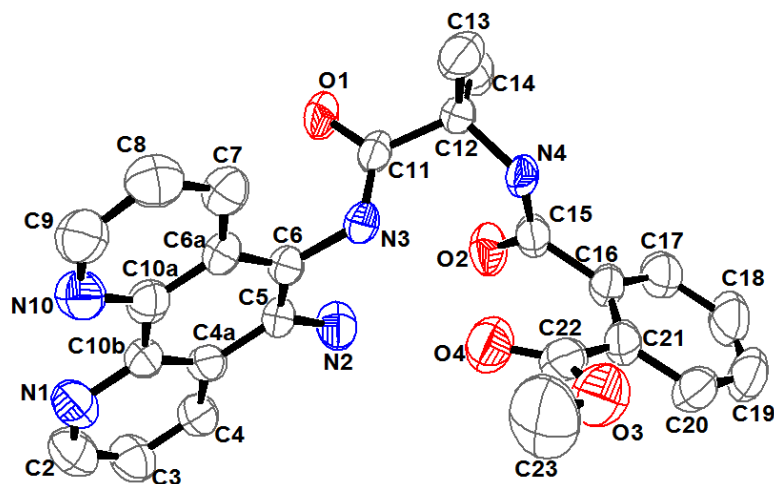


Figura 6.3. Estructura del compuesto 13 obtenida por difracción de rayos X, para mayor claridad los hidrógenos han sido omitidos.

Parámetro	Compuesto 13	Parámetro	Compuesto 13
Formula empírica	C ₂₆ H ₂₇ N ₅ O ₅	Rango θ de colección de datos (°)	1.98 a 25.35
Peso formula	489.53	Datos/restricciones/parámetros	4587 / 45 / 365
Temperatura (K)	298	Reflexiones colectadas	27740
Longitud de onda (Å)	0.71073	Reflexiones independientes	4587 [$R(\text{int}) = 0.0758$]
Sistema cristalino	Ortorrombico	Corrección de absorción	Ninguna
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Método de refinamiento	cuadrados mínimos
Dimensiones de la celda unitaria en (Å y °)	$a = 11.8300$ $\alpha = 90$ $b = 13.8561$ $\beta = 90$ $c = 15.2679$ $\gamma = 90$	Rango de índices	$-14 \leq h \leq 14$ $-16 \leq k \leq 16$ $-18 \leq l \leq 18$
Volumen (Å ³)	2502.7	Calidad de ajuste en F^2	0.814
Z	4	Índices finales $R[I > 2\sigma(I)]$	$R1 = 0.0406$, $wR2 = 0.0719$
Densidad (Mg/m ³)	1.299	Índices R (todos los datos)	$R1 = 0.0853$, $wR2 = 0.0812$
Coefficiente de absorción (mm ⁻¹)	0.092	Máximo-mínimo de densidad Electrónica residual (eÅ ⁻³)	0.270 y -0.156
$F(000)$	1032		
Tamaño del cristal (mm)	0.20 x 0.14 x 0.13	Color	amarillo / prisma

Tabla 6.1. Parametros cristalográficos del compuesto 13

Átomos	Distancia Å	Átomos	Distancia Å
N2-C5	1.360	N4-C12	1.476
N3-C6	1.430	N4-C15	1.328
N3-C11	1.339		

Tabla 6.2. Distancias de enlace N-C de la amina y las amidas del compuesto 13

En la tabla 6.2 se puede observar que la distancia C-N de la amina es similar a la distancia N-C con el carbonilo de las amidas, esto corrobora el efecto inductivo de los anillos piridínicos que es similar al carbonilo y provoca que la distancia sea menor y el par electrónico de la amina este menos disponible, mientras que las distancias N-C de los grupos sustituyentes de las amidas son más largas.

6.2. TAML modificado en la cola con 2,2'-bipiridina bpyTAML

Debido a que no fue posible obtener el ligante phenTAML, se decidió plantear una segunda opción para modificar la estructura del TAML, en este caso integrando un fragmento de 2,2'-bipiridina en la parte de la cola del ligante.

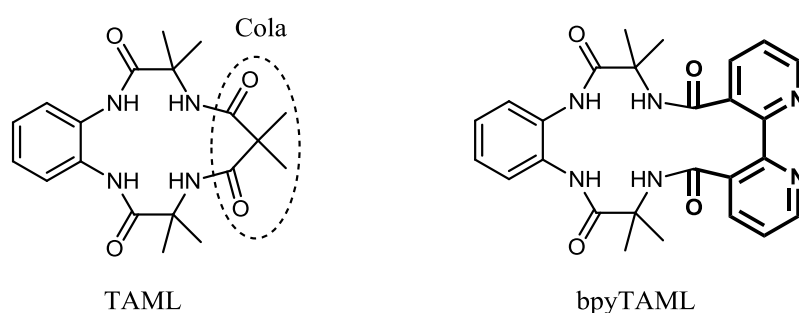


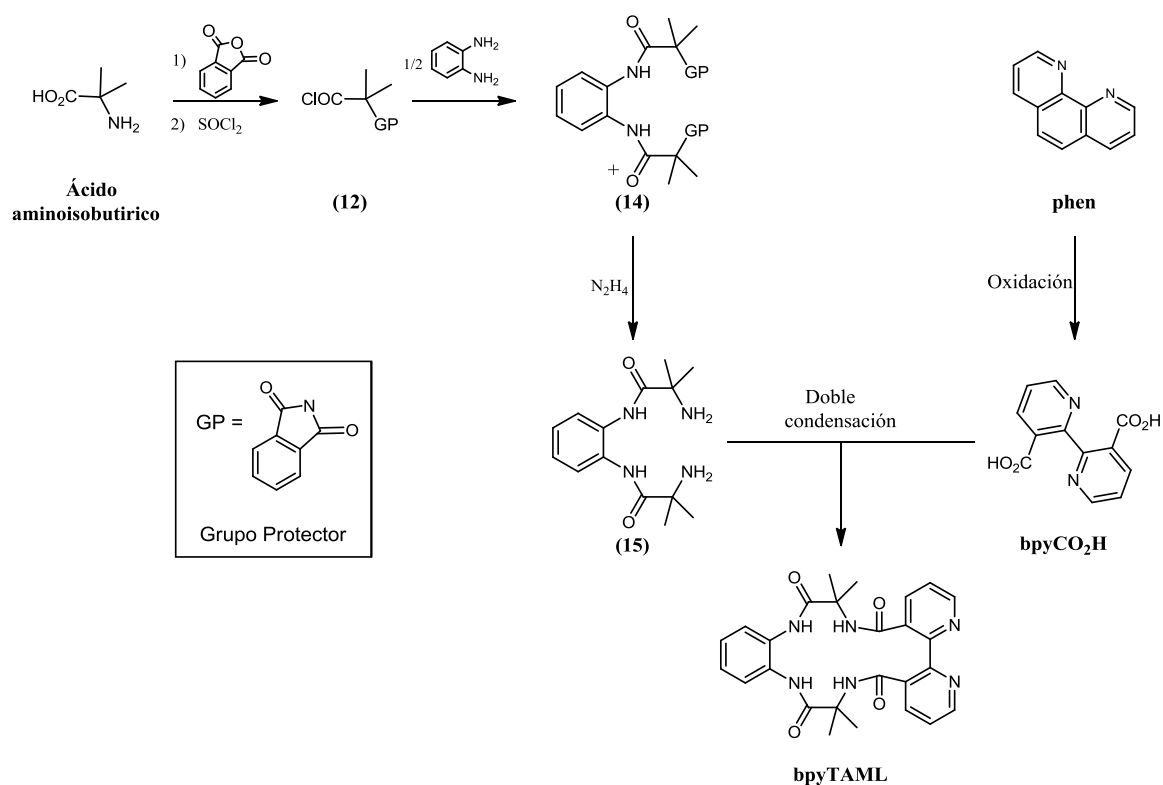
Figura 6.4. Segunda propuesta de ligante bpyTAML

En la estructura del bpyTAML podemos observar la cavidad central rodeada de los 4 grupos amida. Sin embargo, el macrociclo que se forma es de 16 miembros, más grande en comparación con otros TAML's de 13 miembros. Por su parte, la bipiridina es un buen quelato coordinante, pero su fuerza de coordinación disminuye en comparación con la fenantrolina. Además es importante notar que en el fragmento de bipiridina los anillos no son necesariamente coplanares, debido a que pueden girar sobre el enlace que une los 2 anillos y formar un ángulo entre ellos, lo cual limita su función como quelato bidentado.

Analizando la síntesis del bpyTAML a través de la ruta amidon, observamos que desde la primera reacción se requiere la presencia del fragmento de bipiridina en forma de **bpyCO₂H** y durante el resto de la síntesis este fragmento continuaría presente. Debido a la experiencia obtenida anteriormente trabajando con los compuestos **phenNH₂** y **bpyCO₂H** donde nos encontramos con problemas y limitaciones; principalmente causados por la baja solubilidad de estos compuestos y sus derivados. Al final se llegó a la conclusión de que la ruta amidon no representaba la mejor opción para esta síntesis.

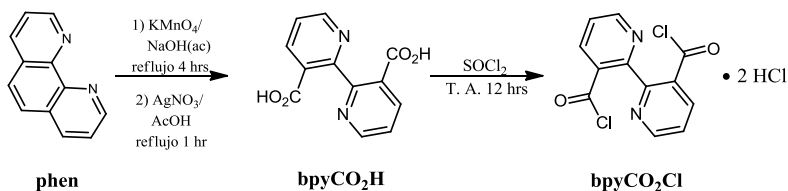
Por otro lado, en la ruta diamina-diamida se ensambla todo el esqueleto del ligante en los primeros 4 pasos y es hasta la última reacción en donde interviene el fragmento de bipyridina, por lo que esta ruta fue seleccionada como la mejor opción para preparar el bpyTAML.

Para sintetizar el bpyTAML mediante la ruta diamina-diamida se debieron preparar los compuestos *N,N'*-(1,2-fenilen)bis(2-amino-2-metilpropanamida) (**15**) y **bpyCO₂H** (ver sección 5.2.1) y llevar a cabo una doble condensación entre estas especies.



Con esta síntesis el efecto inductivo de las piridinas recae sobre los grupos carboxílicos, que actúan como electrófilos durante la reacción de condensación, por lo cual al contrario de la propuesta anterior, el efecto de las piridinas puede beneficiar la reacción aumentando la electrofilicidad del carboxilo.

Para aumentar la reactividad de **bpyCO₂H** hacia la reacción de condensación, el grupo carboxílico fue transformado en su correspondiente cloruro de acilo (**bpyCO₂Cl**) haciéndolo reaccionar con SOCl₂. En el espectro de IR se observa la pérdida de la banda de los ácidos carboxílicos y el desplazamiento de la banda del carbonilo a 1707 cm⁻¹.



Esquema 6.5. Síntesis del compuesto bpyCO₂Cl

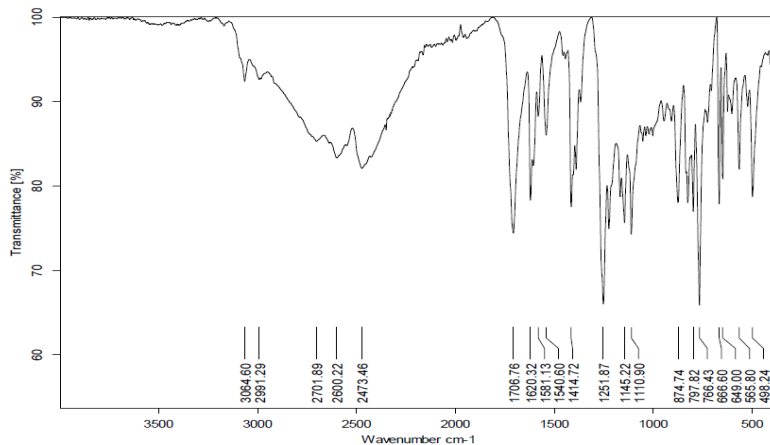
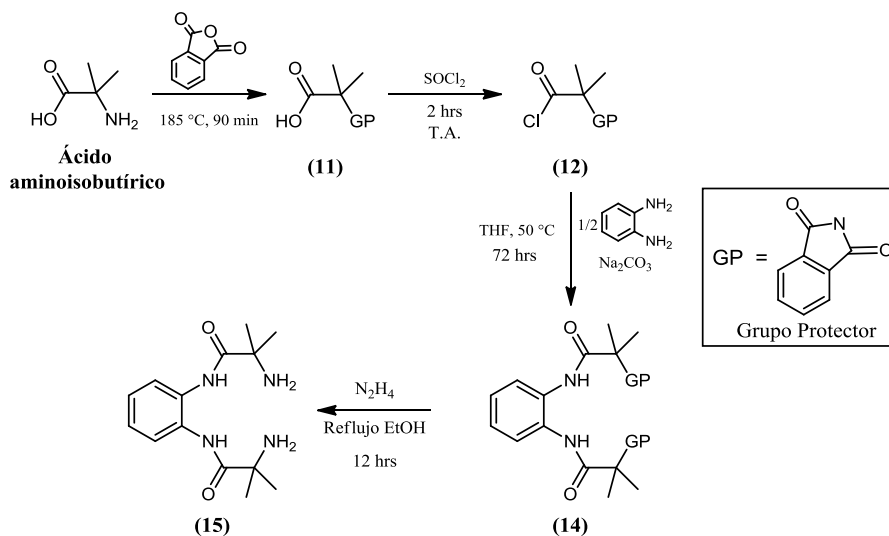


Figura 6.5. Espectro de IR del compuesto bpyCO₂Cl

La síntesis del compuesto **15** se llevó a cabo partiendo del ácido-2-aminoisobutírico siguiendo el procedimiento descrito en la literatura.⁴⁻⁶



Esquema 6.6. Síntesis del compuesto 15

La primera reacción consiste en la protección del grupo amino utilizando el anhídrido ftálico, formando el grupo protector (GP) ftalamida. La reacción se lleva a cabo en ausencia de disolvente a una temperatura de 185 °C (punto de fusión del compuesto **11**). Durante la purificación del producto **11** es de suma importancia controlar el pH, puesto que si el medio llega a un pH menor a 3, el producto se contamina con ácido ftálico. El

compuesto **11** fue caracterizado por RMN ^1H , punto de fusión y espectroscopía infrarroja, coincidiendo con lo informado (anexo A7).⁵

La segunda reacción consistió en la formación del cloruro de acilo del ácido **11**, con el propósito de aumentar la electrofilicidad del carbonilo debido a que la siguiente reacción se trata de una condensación. La formación del cloruro de acilo **12** se llevó a cabo disolviendo **11** en SOCl_2 a temperatura ambiente (si la reacción se calienta produce derivados del SOCl_2 que contaminan el producto, anexo A7).⁷

La tercera reacción es una doble condensación entre el cloruro de acilo **12** y la 1,2-fenilendiamina para obtener el compuesto **14**. En esta reacción se cambió la base utilizada en la literatura⁴ (Et_3N) por Na_2CO_3 en exceso. Con esta modificación el tiempo de reacción aumentó de 24 horas (en el procedimiento original) a 36 horas, sin embargo el proceso de purificación resultó mucho más sencillo. Además, el rendimiento obtenido aumentó de 75% (reportado anteriormente) a 82%. El producto se caracterizó por RMN ^1H , espectroscopía infrarroja y punto de fusión obteniendo los mismos resultados informados.⁴

La desprotección de los grupos amina se llevó a cabo por tratamiento con hidracina como agente reductor, a reflujo de disolución etanólica como se informa en la literatura.⁸ En la síntesis del compuesto **15** se obtuvo un rendimiento global de 47 %.

Finalmente, la síntesis del ligante bpyTAML se llevó a cabo haciendo reaccionar los compuestos **15** y bpyCO_2Cl a 50 °C por 72 horas en THF. Durante la reacción se generan 4 moléculas de HCl por lo cual se adicionaron 4 equivalentes de Et_3N para neutralizarlas. La reacción se debe trabajar en disolventes apróticos y anhidros debido al cloruro de acilo. Por esta razón se utilizó THF a pesar de la baja solubilidad del compuesto, lo cual influye en mayores tiempos de reacción comparado a la síntesis de otros TAML's.

El ligante bpyTAML fue purificado a través de filtraciones y lavados con CH_2Cl_2 , CH_3CN y éter y fue caracterizado por espectroscopía de RMN ^1H , donde se observan 5 señales en la zona aromática, asignados a los 3 hidrógenos del fragmento de bipyridina y 2 del anillo aromático en la cabeza del ligante. También se observa una señal en la zona

alifática que se asignó a los metilos en 1.6 ppm. No se observan los hidrógenos de los grupos amida, un efecto común en hidrógenos unidos a heteroátomos, en donde puede ocurrir un rápido intercambio de hidrógeno por deuterio en disolventes polares como CD₃OD y DMSO-d₆.⁹

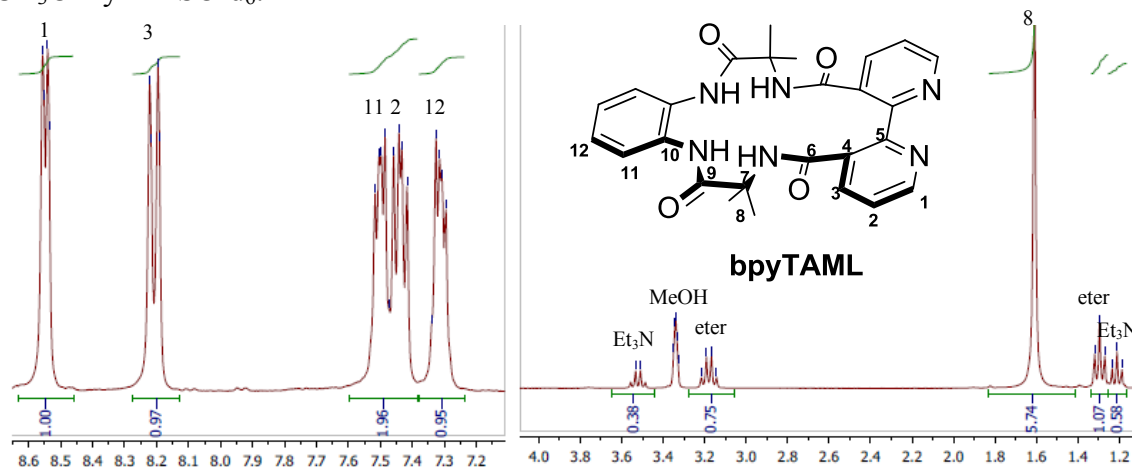


Figura 6.6. Espectro de RMN ¹H del ligante bpyTAML en CD₃OD.

En el espectro de RMN ¹³C se observan 2 señales de carbonilo en 172.0 y 171.1 ppm, 8 señales asignadas a los carbonos aromáticos y 2 más en 56.7 ppm y 23.8 ppm asignadas a los carbonos alifáticos. Además se obtuvo el espectro de 2 dimensiones de correlación C-H (HETCOR) a través del cual se pudo hacer la asignación de las señales (anexo A8).

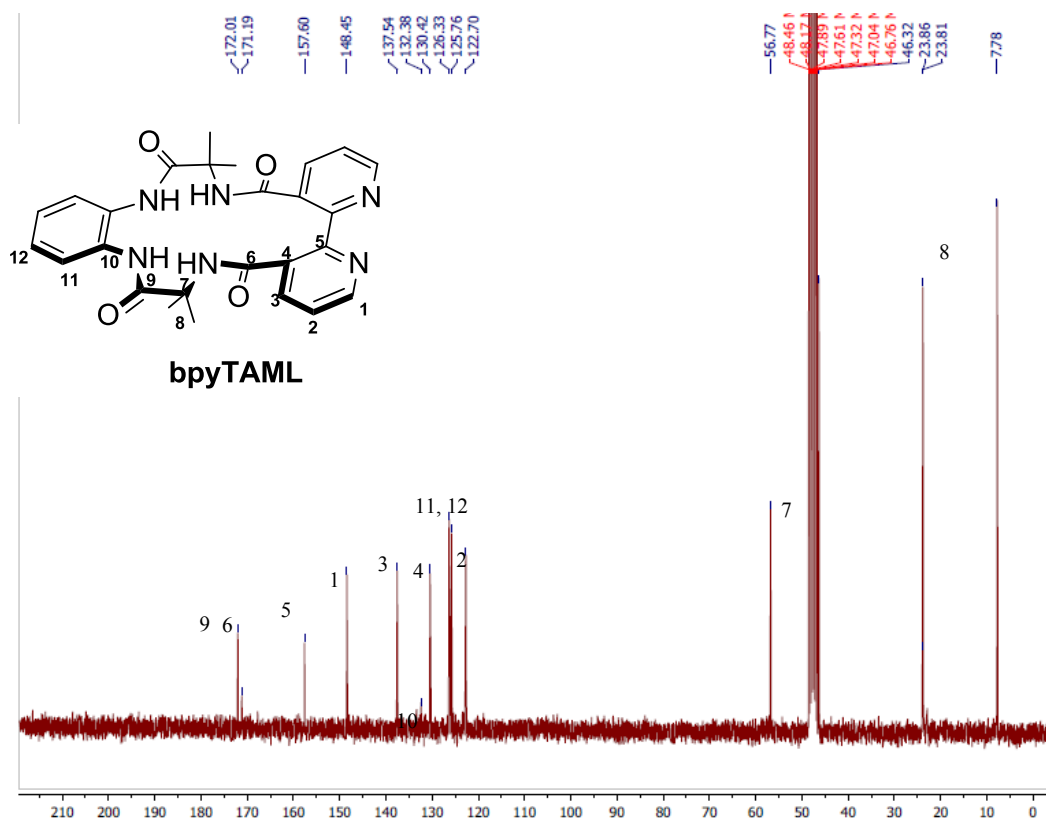


Figura 6.7. Espectro de RMN ¹³C de bpyTAML en CD₃OD

Cabe notar que en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se observa una señal para cada pareja de núcleos por lo cual aparentemente se tiene una molécula simétrica, (esta parte será discutida a mayor profundidad en la sección 7.4)

En espectrometría de masas ESI^+ se observa la señal del ion molecular en 557 m/z correspondiente a $[\text{M}+\text{THF}]^+$. El análisis elemental obtenido corresponde a la estructura propuesta para bpyTAML con 2 moléculas de agua.

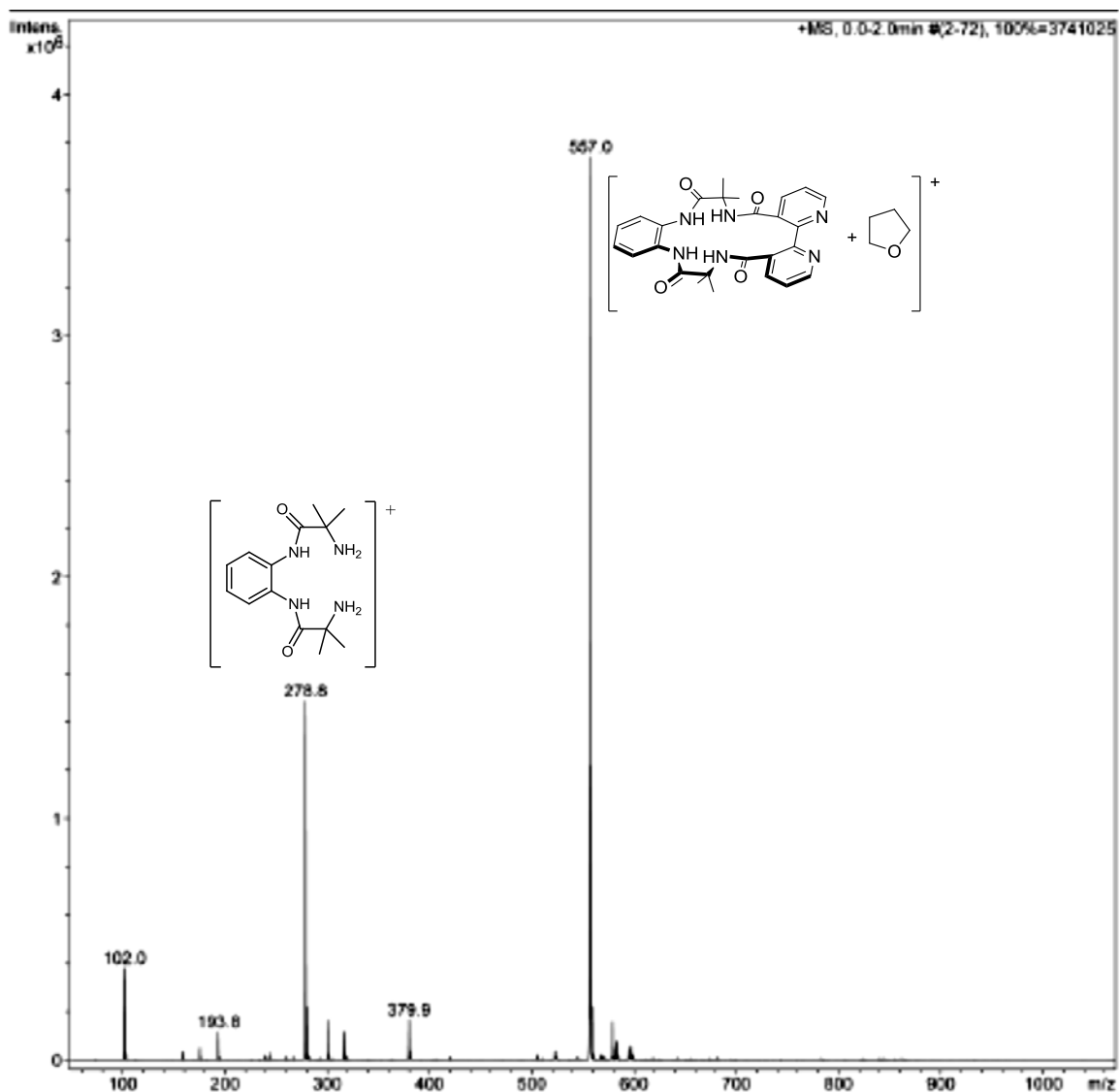


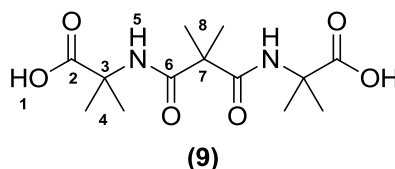
Figura 6.8. Espectro de masas ESI^+ en MeOH del bpyTAML

6.3. Parte experimental.

Síntesis de ácido ((2,2'-dimetilmalonil)bis(azanedil))bis(2-metilpropanoico) (9)

Esta síntesis se llevó a cabo siguiendo el procedimiento informado por S. W. Gordon-Wylie y T. J. Collins.² En un matraz se disolvieron de 2.0 g (19 mmol) de ácido 2-aminoisobutírico en 25 mL de piridina y se calentó a 50 °C. Una disolución de 1.8 mL (10 mmol) de cloruro de dimetil malonilo en 10 mL de piridina, se adicionó gota a gota. La mezcla de reacción se agitó por 36 horas a 50 °C. Se observó la formación de un precipitado blanco. Se adicionaron 3 mL de agua que disolvió el precipitado y se agitó 24 horas más a temperatura ambiente. Se evaporó el disolvente al vacío; se adicionaron 2 mL de agua y 2.5 mL de HCl concentrado al residuo aceitoso y se enfrió en un baño de hielo. Se observó la formación de un precipitado blanco el cual se filtró al vacío y secó a 80 °C al vacío durante 12 horas. Se obtuvieron 1.1 g (3.6 mmol) del producto. (Rendimiento 38 %).

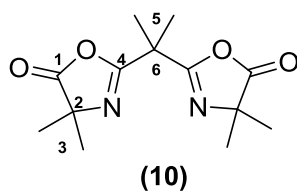
¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 12.33 (*s*, 2 H, **H1**), 7.50 (*s*, 2 H, **H5**), 1.37 (*s*, 12 H, **H4**), 1.27(*s*, 6H, **H8**). ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ: 175.64 (CO, **C2**), 172.28 (CO, **C6**), 55.30 (**C3**), 49.20 (**C7**), 24.64 (**C4**), 23.38 (**C8**). IR (cm⁻¹): 3313 (NH), 3064 (OH), 1717 (CO-2), 1621 (CO-6).



Síntesis de 2,2'-(propan-2,2'-diil)-4,4'-(dimetiloxasol-5(4H)-ona) (10)

Una mezcla de 500 mg (1.6 mmol) de **9**, 0.3 mL de cloruro de acetilo (3.2 mmol), 0.40 mL (3.2 mmol) de Et₃N y 10 mL de tolueno, fue calentada a reflujo por 12 horas. Se evaporó el disolvente al vacío y el producto se purificó por sublimación al vacío a 100 °C. Se obtuvieron 270 mg de cristales sublimados. (Rendimiento de 62 %).

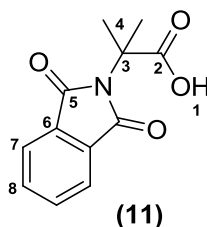
¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 1.56 (*s*, 6 H, **H6**), 1.38 (*s*, 12 H, **H3**). ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ: 175.64 (CO, **C2**), 179.63 (CO, **C1**), 162.58 (C=N, **C4**), 64.77 (**C2**), 39.17 (**C5**), 23.37 (**C3**), 21.26 (**C6**). IR (cm⁻¹): 1818 (N=C), 1665 (CO).



Síntesis de ácido 2-ftalamido propiónico (11)

Se sintetizó utilizando el método descrito por C. S. Wood y I. Stirling.⁵ Una mezcla de 1.2 g (11 mmol) de ácido 2-aminoisobutírico y 2.4 g (16 mmol) de anhídrido ftálico fue fundida a 190 °C y se agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción se dejó enfriar al aire, y el sólido resultante se disolvió en 25 mL de una disolución acuosa de NaHCO₃ 10%. La disolución se filtró con papel y se agregó lentamente HCl 0.5 M hasta llegar a un pH = 3. Se observó la formación de un precipitado, el cual se filtró al vacío con vidrio poroso y se secó a 120 °C por 24 horas. Se obtuvieron 2.21g (9.5 mmol) de producto. (Rendimiento de 82 %)

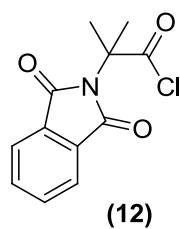
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ: 12.90 (*s*, 1 H, **H1**), 7.86 (*s*, 4 H, **H7 y H8**), 1.73 (*s*, 6 H, **H4**)
¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ: 173.89 (CO, **C2**), 167.96 (CO, **C5**), 134.65 (**C8**), 131.10 (**C6**), 122.92 (**C7**), 59.73 (**C3**), 24.23 (**C4**). IR (cm⁻¹): 3031 (OH), 1770, 1671 (CO), 1593 (CO).



Síntesis de cloruro de 2-ftalamidopropanoilo (12)

En un matraz de 2 bocas equipado con una salida a una trampa de NaOH (para neutralizar el HCl desprendido) se disolvió 1.0 g (4.3 mmol) de **11** en 5 mL de SOCl₂, la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó al vacío, el residuo se lavó 3 veces con 5 mL de dietileter anhidro y 5 mL de hexano. El sólido blanco se filtró con vidrio poroso y se secó al vacío durante 24 horas. Se obtuvieron 1.05 g de producto. (Rendimiento 97%). El producto debe ser almacenado bajo atmósfera inerte.

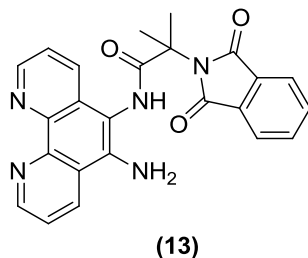
IR (cm⁻¹): 1774 (CO), 1714 (COCl), al disolver el producto en disolvente deuterado para hacer la RMN ¹H, el producto reacciona y se forma nuevamente el ácido carboxílico por lo que no se pudo obtener datos de RMN.



Síntesis de *N*-(6-amin-1,10-fenantrolin-5-il)-2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)-2-metilpropanamida (13)

Una mezcla de 70 mg (0.33 mmol) de **phen(NH₂)₂**, 165 mg (0.66 mmol) de **12**, 0.1 mL (0.7 mmol) de Et₃N y 20 mL de 1,2-dicloroetano se calentó a reflujo durante 48 horas. Se obtuvo un sólido amarillo, el cual se filtró al vacío con vidrio poroso y se lavó con THF. El precipitado fue suspendido en 5 ml de una disolución acuosa de NaOH a pH = 12, se agitó por 5 minutos y se filtró al vacío. El sólido obtenido se lavó con éter y se secó a 80 °C durante 24 horas. Se obtuvieron 100 mg (0.23 mmol) del producto. (Rendimiento de 70%).

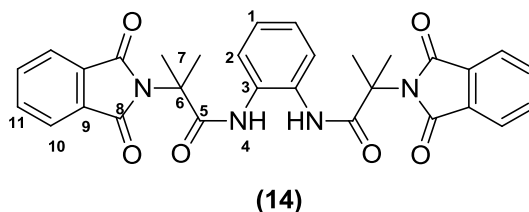
¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 9.79 (*s*, 1 H, **NH**), 9.05 (*d*, 1H), 8.73 (*d*, 2 H), 8.03 (*d*, 1H), 8.01 (*d*, 4H), 7.88 (*d*, 1H), 7.77 (*d*, 1H), 5.87 (*s*, 2H, **NH₂**), 1.95 (*s*, 6H, **CH₃**). IR (cm⁻¹): 3340 νNHCO, 3201, νNH, 1713 νCO, 1641 νCO.



Síntesis de *N,N'*-(1,2-fenilen)bis(2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)-2-metilpropanamida) (14)

La reacción se llevó a cabo modificando el método reportado por C. P. Horwitz y A. Gosh.⁴ Una mezcla de 2.0 g (8.0 mmol) de **12**, 436 mg (4.0 mmol) de *o*-fenilendiamina (la cual fue previamente purificada por sublimación al vacío a 90 °C), 2.0 g (20.0 mmol) de Na₂CO₃ y 100 mL de THF seco, se calentó a 50 °C durante 48 horas. Se evaporó el disolvente al vacío, el residuo se suspendió en 40 mL de agua desionizada y la mezcla se agitó por 3 horas. Se filtró al vacío y el sólido obtenido se lavó con agua caliente y con 20 mL de éter etílico y se secó a 80 °C durante 48 horas. Se obtuvieron 1.88 g (3.5 mmol) del producto. (Rendimiento de 82 %).

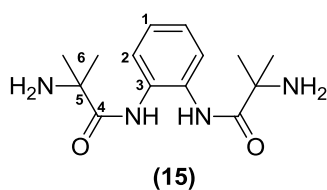
^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.44 (s, 2 H, **H4**), 7.84 (dd, 4 H, $^2J = 5.2$, $^3J = 3.1$, **H10**), 7.76 (dd, 4H, $^2J = 5.2$, $^3J = 3.1$, **H11**), 7.50 (dd, 2H, $^2J = 5.7$, $^3J = 3.6$, **H2**), 7.16 (dd, 2H, $^2J = 5.7$, $^3J = 3.6$, **H1**), 1.73 (s, 6 H, **H7**) ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 171.99 (CO, **C5**), 168.27 (CO, **C8**), 134.43 (**C9**), 131.63 (**C11**), 130.45 (**C3**), 125.07 (**C2**), 124.71 (**C1**), 122.83 (**C10**), 61.02 (**C6**), 24.31(**C7**). IR (cm^{-1}): 3340 (NHCO), 3247(NH), 1695 (CO), 1662 (CO).



Síntesis de *N,N'*-(1,2-fenilen)bis(2-amino-2-metilpropanamida) (**15**)

Una suspensión de 1.0 g (1.8 mmol) del producto **14**, en 30 mL de etanol se calentó a reflujo, y se adicionó gota a gota 3 mL de una disolución etanólica de hidrato de hidracina 25 %. La mezcla de reacción se mantuvo en reflujo por 12 horas y se evaporó el disolvente al vacío. El residuo se suspendió en 60 mL de una disolución acuosa 2 M de HCl y se agitó durante 2 horas a 85 °C. La disolución se filtró en caliente a través de papel filtro y se enfrió en un baño de hielo. Lentamente, se agregó una disolución de NaOH concentrada hasta llegar a pH 12. El producto se extrajo 3 veces con 45 mL de CH_2Cl_2 , los extractos de color amarillo se secaron con Na_2SO_4 y se evaporó el disolvente al vacío. El sólido resultante se lavó con 10 mL de éter etílico y se secó al vacío a 80 °C durante 12 horas. Se obtuvieron 360 mg (1.3 mmol) de producto. (Rendimiento de 70 %).

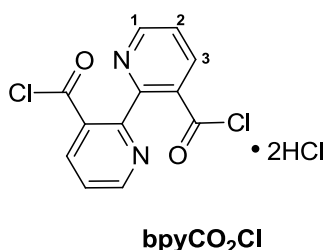
^1H RMN (CD_3OD) δ : 7.63 (dd, 2 H, $^2J = 6.0$, $^3J = 3.6$, **H2**), 7.25 (dd, 2 H, $^2J = 6.0$, $^3J = 3.6$, **H1**), 1.45 (s, 12 H, **H6**) ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 173.89 (CO, **C4**), 134.65 (**C3**), 131.10 (**C2**), 122.92 (**C1**), 59.73 (**C5**), 24.23 (**C6**). IR (cm^{-1}): 3387, 3358 (NHCO), 3238, 3187 (NH₂), 1657 (CO).



Síntesis de hidrocioruro de [2,2'-bipiridin]-3,3'-dicarbonildicloruro (bpyCO₂Cl)

En un matraz de 2 bocas equipado con una salida a una trampa de NaOH (para neutralizar el HCl desprendido) se suspendió 1.0 g (3.6 mmol) de **bpyCO₂H** en 5 mL de SOCl₂ y la mezcla de reacción se agitó durante 12 horas. El disolvente se evaporó al vacío, el residuo se lavó 3 veces con 5 mL de éter anhidro y 5 mL de hexano. El sólido amarillo se filtró con vidrio poroso y se secó al vacío durante 24 horas. Se obtuvieron 500 mg (1.6 mmol) de producto. Rendimiento de 95%. El producto debe ser almacenado bajo atmósfera inerte.

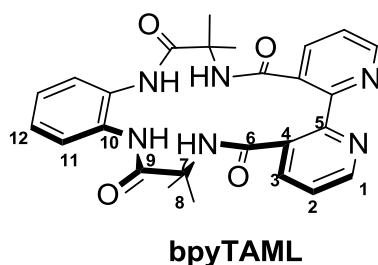
¹H RMN (DMSO-d₆) δ: 8.85 (dd, 2 H, ²J = 5.0, ³J = 1.5, **H1**), 8.54 (dd, 2 H, ²J = 7.9, ³J = 1.5, **H3**), 7.78 (dd, 2 H, ²J = 7.9, ²J = 5.0, **H2**). IR (cm⁻¹) 2580, 2445 (NH⁺Cl⁻), 1726 (COCl).



Síntesis de bpyTAML.¹⁰

Una mezcla de 1.0 g (3.6 mmol) de **15**, 1.27 g (3.6 mmol) de **bpyCO₂Cl** y 2 mL (14.4 mmol) de Et₃N en 20 mL de THF se calentó a 50 °C y se agitó durante 72 horas. El disolvente se evaporó al vacío. El residuo fue suspendido en 10 ml de acetona y filtrado al vacío sobre vidrio poroso y lavado con 10 ml de 2-propanol. El sólido obtenido se suspendió en una mezcla 9:2 de acetona-agua y se filtró al vacío. Finalmente, el precipitado fue lavado con éter etílico y secado a 80 °C al vacío por 24 horas. Se obtuvieron 1.13 g (2.3 mmol) de producto. (Rendimiento 64 %).

¹H RMN (CD₃OD) δ: 8.55 (d, 2 H, ²J = 4.8, **H1**), 8.21 (d, 2 H, ²J = 7.8, **H3**), 7.52 (dd, 2 H, ²J = 6.1, ²J = 3.5, **H11**), 7.45 (dd, 2 H, ²J = 7.8, ²J = 4.9, **H2**), 7.30 (dd, 2 H, ²J = 6.1, ²J = 3.5, **H12**), 1.64 (s, 12 H, **H8**). ¹³C RMN (CD₃OD) δ: 172.01 (CO, **C9**), 171.18 (CO, **C6**), 157.60 (**C5**), 148.45 (**C1**), 137.54 (**C3**), 132.38 (**C10**), 130.42 (**C4**), 126.33 (**C12**), 125.76 (**C11**), 122.70 (**C2**), 56.77 (**C7**), 23.81 (**C8**). IR (cm⁻¹): 3195 (NH), 1666 (CO), 1623 (CO). UV-Vis (MeOH): λ_{max} = 242 nm, ε = 13500 M⁻¹cm⁻¹. ESI-MS (modo positivo): m/z 558 [M + THF]⁺. Anal. elem. Calculado para C₂₆H₂₆N₆O₄·2.5H₂O (%): C, 58.75; H, 5.88; N, 15.81. Encontrado: C, 59.03; H, 5.53; N, 15.71.



6.4. Referencias

1. Popescu, D-L.; Chanda, A.; Stadler, M.; Tiago de Oliveira, F.; Ryabov, A. D.; Munck, E.; Bominaar, E. L.; Collins, T. J. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, 252, 2050.
2. Gordon-Wylie S W.; Collins T.J., *U. S. Patent 6,051,704*, **2000**.
3. Werner, B.; Walter, P.; Wolfgang, B. *Z. Naturforsch. B: J. Chem. Sci.* **2000**, 55, 946.
4. C.P. Horwitz, A. Ghosh, *US Patent 7,060,818*, **2006**.
5. Al-Hassan, S.; Cameron, R. J.; Curran, A. W.; Lyall, W. J. S.; Nicholson, S. H.; Robinson, D. R.; Stuart, A.; Suckling, C. J.; Stirling, I.; Wood, H. C. S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1985**, 1645.
6. Uphami, S. D.; Dermer, O. C. *J. Org. Chem.*, **1957**, 22, 799.
7. Riley, H.; Brauer G. *Handbook of preparative inorganic chemistry* vol. 1, 2nd Edition **1963**, Academic Press, New York, N. Y. p 383.
8. Allinger, N. L. *Química orgánica*, 2^a Edición **1984**, Reverté, Barcelona, España p 805.
9. Tadeo, X.; Castaño, D.; Millet, O. *Protein Sci.* **2007**, 16, 2733.
10. Saavedra-Díaz, R. O.; Le Lagadec, R.; Shen, L. Q.; Ryabov, A. D. *J. Coord. Chem.* **2014**, 67, 3909.

7. Metalación del bpyTAML y reacciones para ensamblar el ligante al complejo de rutenio

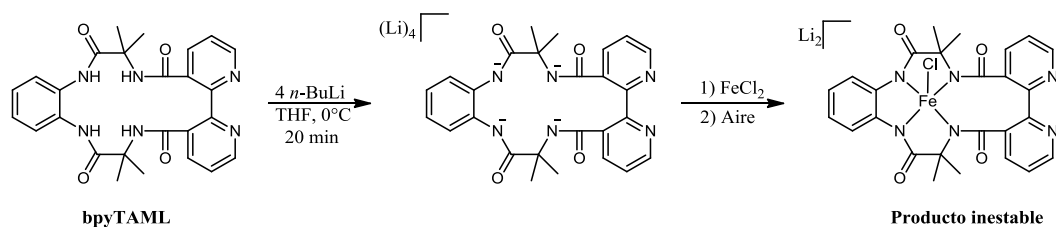
En este capítulo se exponen las reacciones de metalación sobre el ligante bpyTAML anteriormente sintetizado, es decir, las reacciones llevadas a cabo para enlazar metales de transición (Fe, Co, Ni y Cu) en la cavidad central del ligante, así como las reacciones para coordinar la bipyridina presente en el bpyTAML a rutenio para obtener el complejo bimetalico propuesto.

7.1. Metalación del bpyTAML

La metalación de los TAML's consiste en desprotonar los 4 grupos amida del ligante utilizando bases fuertes, inmediatamente después introducir el metal en forma de sal divalente, generalmente como cloruro (excepto en el caso de cobre). Para llevar a cabo este procedimiento se requieren condiciones anhidras y disolventes apróticos, usualmente se utiliza THF.¹

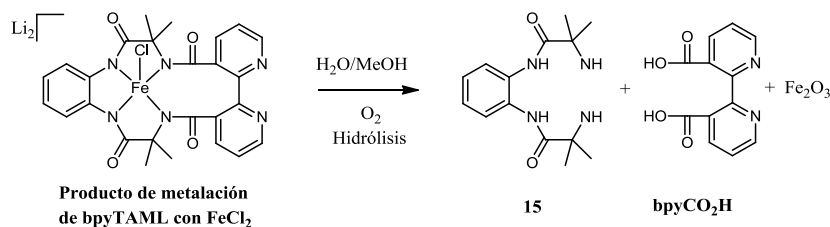
7.1.1. Metalación con hierro

El hierro fue el primer metal que utilizamos para la metalación del bpyTAML. La reacción se llevó a cabo basándonos en el procedimiento establecido anteriormente para la metalación de otros TAML's.² Este método consiste en suspender el ligante en THF y adicionar 4 equivalentes de *n*-BuLi para desprotonar las amidas. Durante la reacción se pudo observar que el ligante (insoluble en THF) se va disolviendo lentamente conforme se adiciona el *n*-BuLi. Esto debido a la formación de la especie desprotonada en el medio de reacción, la cual confiere una tonalidad amarilla a la disolución. Una vez disuelto el ligante, se agregó FeCl₂ y se observó la precipitación de un sólido verde, el cual se presume como el complejo de Fe^{II} basados en la literatura, donde se informa que durante la metalación de los TAML's en primer lugar se forma un precipitado verde sensible al aire correspondiente a especies Fe^{II}-TAML. Este sólido al estar en contacto con aire, inmediatamente cambió de color de verde a rojo coincidiendo con la literatura, donde se informa sobre la oxidación del Fe^{II}-TAML con el oxígeno del aire produciendo el Fe^{III}-TAML de color rojo.³



Esquema 7.1. Metalación de bpyTAML con FeCl₂

El producto formado fue insoluble en hexano, acetona, CH₂Cl₂ y CH₃CN, y poco soluble en MeOH, agua y DMSO, por lo que se intentó purificar a través de lavados y filtraciones con MeOH y agua. Al recuperar el disolvente de los lavados hechos con MeOH y agua y evaporarlo al vacío, se obtuvo un residuo donde fue posible caracterizar los compuestos **BpyCO₂H** y **15**, por lo cual se observa que durante la purificación el ligante sufrió una hidrólisis. Por otro lado, se recuperó el precipitado de los lavados como una pequeña cantidad de un sólido rojo que no fue posible caracterizar. Se cree que se trata de óxidos de hierro producto de la descomposición del complejo.



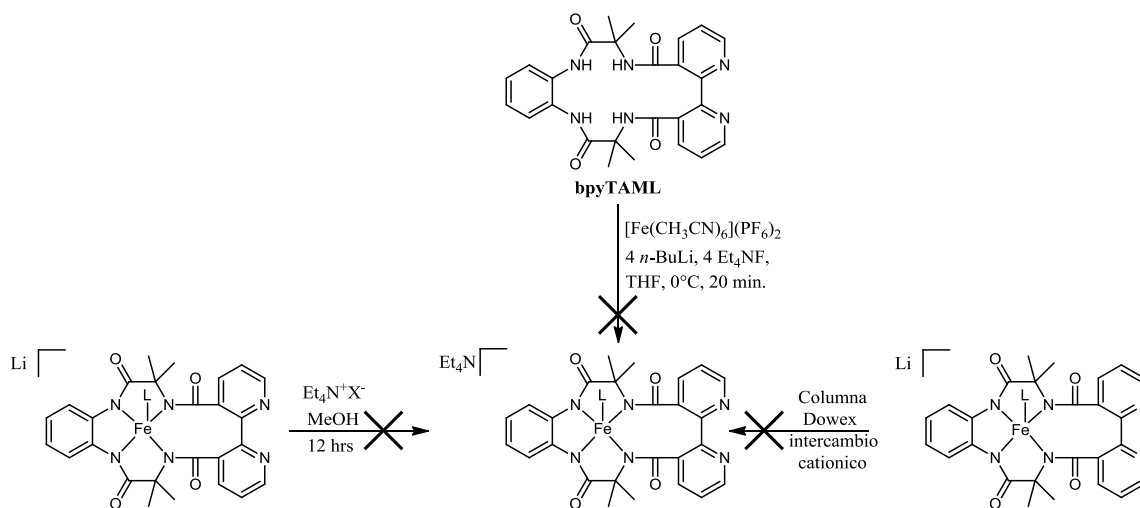
Esquema 7.2. Hidrólisis del FeTAML

El precursor de hierro utilizado fue sustituido por FeCl₃, Fe(acac)₃ y por el complejo [Fe(CH₃CN)₆](PF₆)₂. Con los 2 primeros se buscó evitar el paso de la oxidación producida por el oxígeno, puesto que ya tiene el estado de oxidación esperado. En el tercer caso, se esperaba que al aumentar la solubilidad del precursor de Fe, se acelerara la reacción disminuyendo la descomposición del producto. Sin embargo, en cada caso como producto final se obtuvieron los productos de hidrólisis.

En general los M-TAML's son complejos monoanionicos, por lo tanto el compuesto obtenido de la metalación tiene como catión Li⁺. Se ha informado que estos complejos Li[M-TAML] presentan diversas complicaciones tanto para su purificación como su caracterización, por lo que resulta muy difícil aislarlos.⁴ En la mayoría de los casos, las

especies $\text{Li}[\text{M-TAML}]$ no se purifican, sino que se lleva a cabo una reacción de metátesis para cambiar el catión litio por cationes fosfonio o amonio y obtener complejos tipo $\text{PR}_4[\text{M-TAML}]$ ó $\text{NR}_4[\text{M-TAML}]$, que son solubles en disolventes de menor polaridad como CH_2Cl_2 y CH_3CN y facilitan su posterior purificación.⁴

En nuestro caso se llevaron a cabo varios intentos de metátesis, una vez realizada la metalación y oxidación del complejo con O_2 . El sólido resultante se disolvió en EtOH y se agregó exceso de $\text{Et}_4\text{N}^+\text{X}^-$, ($\text{X} = \text{Cl}$, Br y F). Con ello se esperaba utilizar como fuerza motriz de la reacción la formación de las sales LiX . En particular en el caso del fluor donde se formaría la especie insoluble LiF .⁵ Sin embargo, en ningún caso se obtuvo la metátesis. Para evitar entonces la formación de la especie $\text{Li}[\text{M-bpyTAML}]$ se llevó a cabo la metalación en presencia de $[\text{Et}_4\text{N}]\text{F}$ anhidro, para formar el LiF durante la desprotonación del ligante y evitar la interacción del catión Li^+ con el complejo, pero no se encontró evidencia de la formación del complejo $\text{Et}_4\text{N}[\text{Fe-TAML}]$. Por último, se intentó la metátesis mediante una columna de intercambio ionico, siguiendo el procedimiento informado en la literatura,⁶ pero una vez más se obtuvieron productos de la descomposición del complejo. A través de estos resultados concluimos que el catión de litio en nuestro complejo está interactuando fuertemente con el ligante debido a los nitrógenos del fragmento de bipyridina que lo diferencia de otros TAML's. El complejo con hierro fue imposible de aislar debido a la inestabilidad que presenta por la estructura (con un anillo de 9 miembros en la cavidad), combinado con la alta afinidad del Fe hacia el oxígeno que produce la rápida descomposición del complejo.



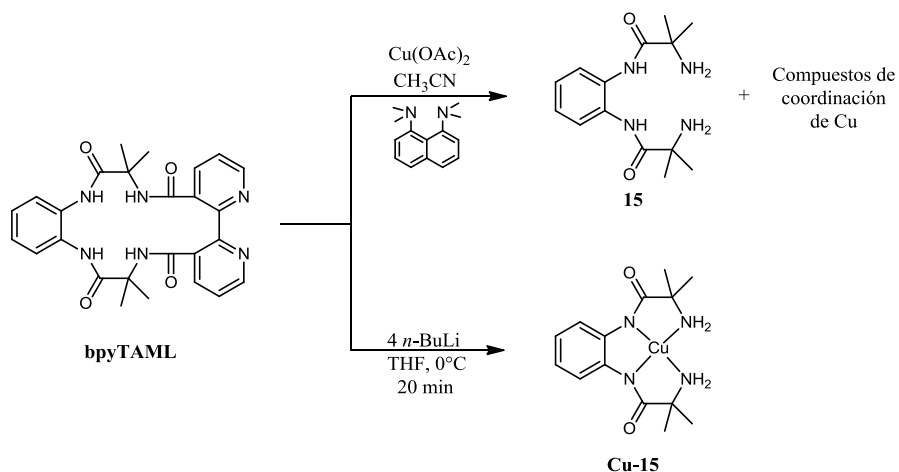
Esquema 7.3. Reacciones de metátesis.

7.1.2. Metalación con cobre

A partir de las observaciones hechas en la metalación con hierro, se decidió cambiar de metal a cobre para probar la metalación del ligante. En la literatura se indica que la metalación con cobre procede de manera diferente a otros metales. El cobre se coordina en el la cavidad del ligante a los nitrogenos *N*-amida y en presencia de una base (de menor pK_b que el *n*-BuLi como esponja de protón), se promueve la desprotonación de los grupos amida formando el complejo.^{7,8.}

La metalación con cobre se intentó inicialmente bajo el procedimiento descrito en la literatura utilizando esponja de protón disuelto en acetonitrilo anhidro. Al adicionar $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ se observó un cambio de coloración y la formación de un precipitado color azul. El precipitado fue lavado con EtOH, el disolvente de los lavados fue evaporado al vacío y se recuperó un sólido blanco que fue el compuesto **15** producto de la hidrólisis del bpyTAML, por lo que se presume que el precipitado azul corresponde a un complejo de coordinación de cobre con el fragmento de bipyridina proveniente de la descomposición del ligante.

Después se utilizó el mismo procedimiento descrito para la metalación con hierro, usando *n*-BuLi para desprotonar y adicionando $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4](\text{PF}_6)_2$. Durante la adición del cobre se observó un cambio de color de azul pálido (precursor) a violeta. Después de la purificación se obtuvo un sólido violeta, resultando ser un complejo de cobre cuyo ligante correspondió al compuesto **15** (ver sección 7.2.1).



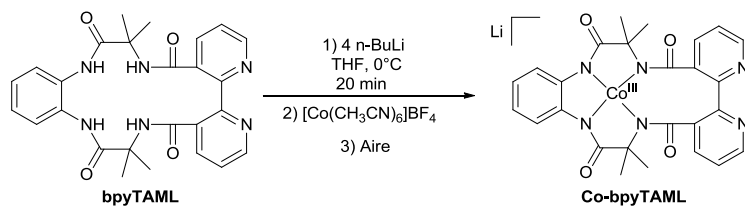
Esquema 7.4. Reacciones de metalación de bpyTAML con cobre

7.1.3. Metalación con cobalto.

La metalación del bpyTAML fue puesta a prueba entonces con cobalto utilizando el mismo método con *n*-BuLi y posteriormente agregando el complejo $[\text{Co}(\text{CH}_3\text{CN})_6](\text{PF}_6)_2$. Durante la adición del precursor de cobalto (color naranja) se observó un cambio rápido de color y la formación de un precipitado color café. Al intentar purificar el producto mediante columnas cromatográficas (alúmina neutra, sílica, sílica C18) se produjo la descomposición del producto por una fuerte interacción entre el compuesto y las columnas cromatográficas, por lo que su purificación fue llevada a cabo a través de lavados con THF y CH_3CN y finalmente fue disuelto en metanol y filtrado. El compuesto obtenido fue soluble en disolventes polares como metanol, agua, DMF y DMSO.

En el espectro de RMN ^1H se observan 5 señales en la zona de los aromáticos 3 de ellas 8.3, 8.0 y 7.3 ppm se asignaron a los hidrógenos del fragmento de bipyridina y las otras 2 señales 8.6 y 6.8 ppm a los hidrógenos del anillo aromático en la cabeza del bpyTAML. Estas señales presentan una gran diferencia en el desplazamiento químico con respecto al ligante libre (7.3 y 7.5 ppm) debido a la influencia del metal enlazado a las amidas. También se observa una señal de alifáticos asignada a los grupos metilo, y se encuentra ligeramente desplazada (1.4 ppm) con respecto al ligante libre (1.6 ppm).

En el espectro de RMN ^{13}C se observan 2 señales con desplazamiento químico en 179.98 y 173.38 ppm correspondiente a los carbonos carbonílicos de los grupos amida. Existen 8 señales entre 120 y 160 ppm asignadas a los carbonos aromáticos del ligante (5 de ellas del fragmento de bipyridina y 3 más del anillo aromático situado en la cabeza del ligante). Se observan 2 señales de alifáticos, una pequeña en 56.91 ppm del carbono cuaternario y una de mayor intensidad en 27.95 ppm debida a los carbonos terciarios de los grupos metilo. Fue posible asignar las señales a través de los espectros DEPT y HETCOR de correlación C-H (anexo A9). Por espectrometría de masas ESI⁻ se observa el ion molecular en 577 *m/z* correspondiente a $[\text{M}+2\text{H}_2\text{O}]^-$ y en donde el patrón isotópico corresponde a un complejo con cobalto. Se obtuvo el análisis elemental que corresponde a la estructura propuesta con la adición de 4 moléculas de agua.⁹



Reacción 7.1. Síntesis de Co-bpyTAML

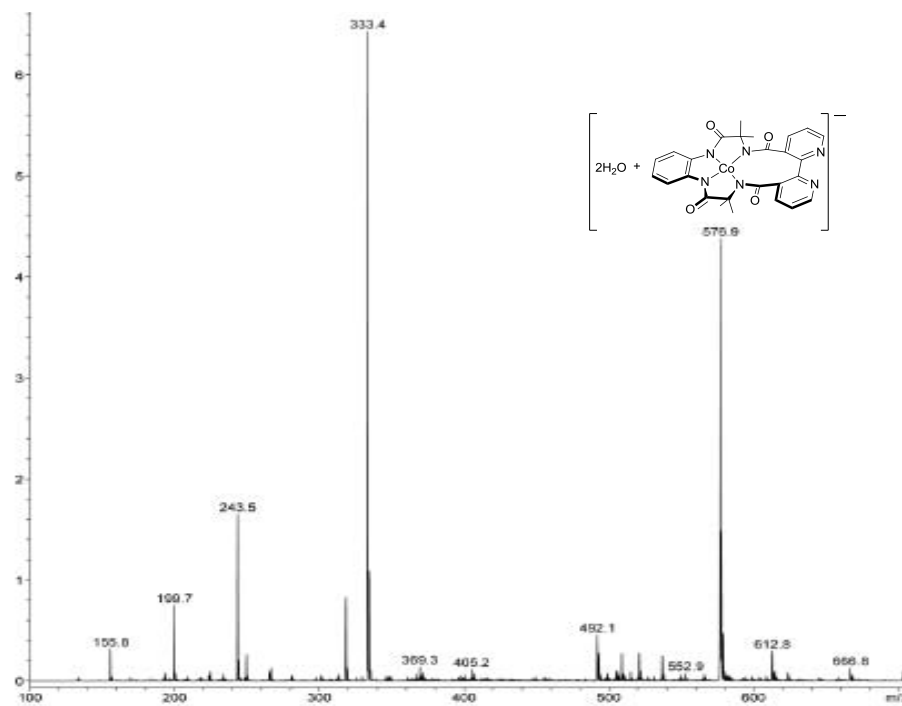


Figura 7.1. Espectro de masas ESI del complejo Co-bpyTAML.

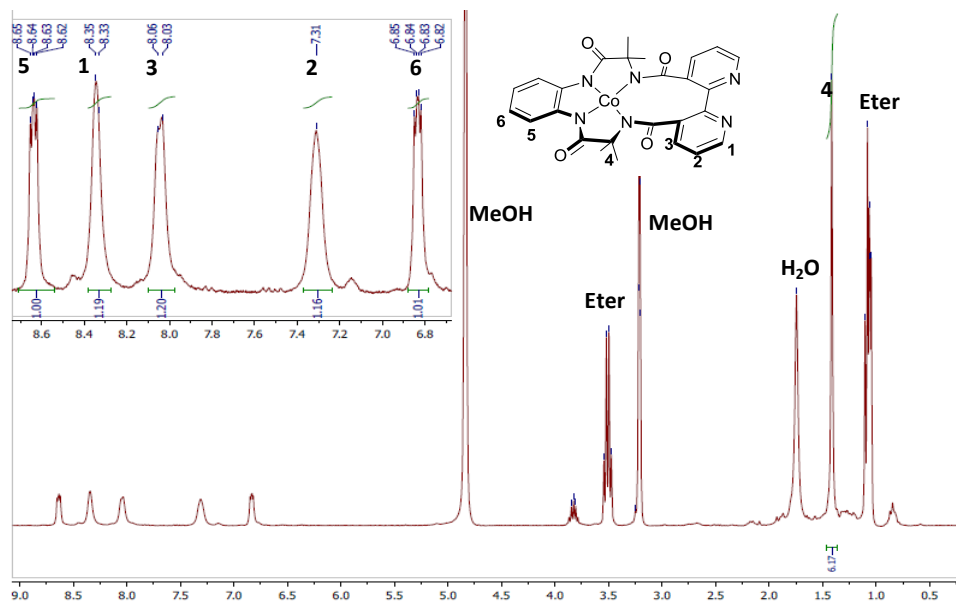


Figura 7.2. Espectro de RMN ^1H en CD_3OD del complejo Co-bpyTAML

En el espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR) no se observó señal alguna para el complejo $\text{Li}[\text{Co-bpyTAML}]$, por tanto se piensa que se trata de una especie diamagnética. Debido a que el cobalto es un metal que se encuentra en la familia 9, y con la condición de ser una especie diamagnética, la estructura que se propone y que cumple con estas características es un complejo octaédrico (con 2 moléculas de agua en las posiciones axiales) de bajo espín y donde el metal se encuentra como Co^{III} .

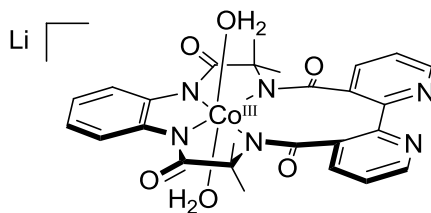


Figura 7.3. Estructura propuesta para el complejo Co-bpyTAML.

Al igual que con el hierro, se realizaron diversos intentos para llevar a cabo la metátesis con objeto de cambiar el catión del complejo e incrementar su solubilidad, pero por ninguna vía se obtuvo evidencia del intercambio catiónico.

7.1.4. Metalación con níquel

Finalmente se llevó a cabo la metalación con níquel utilizando el mismo procedimiento que con Fe y Co. Después de desprotonar el ligante con *n*-BuLi y adicionar a la mezcla de reacción el precursor $[\text{Ni}(\text{CH}_3\text{CN})_6](\text{PF}_6)_2$ (de color azul) se observó un cambio de coloración y la formación de un precipitado amarillo (el producto presentó las mismas dificultades para la purificación y el intercambio de catión encontradas en el caso del cobalto). El complejo fue caracterizado por RMN ^1H , en su espectro se observan las 5 señales de hidrógenos aromáticos, entre las cuales 2 de ellas en 7.60 y 7.20 ppm, se asignan a los hidrógenos del anillo aromático de la cabeza del ligante y cuyo desplazamiento químico permanece casi igual con respecto al ligante libre (similar al caso del cobalto). Las otras 3 señales 8.42, 8.11 y 7.32 ppm corresponden al fragmento de bipyridina en la cola del ligante y se observa un ligero desplazamiento de las mismas con respecto al ligante libre (no tan evidente como en el caso del cobalto). En espectrometría de masas ESI⁻ se observó el ión molecular en 577 *m/z* correspondiente a $[\text{M}+2\text{H}_2\text{O}]^-$ y su patrón isotópico indica que existe níquel en el complejo (éste diferencia a los espectros de masas del $\text{Li}[\text{Co-bpyTAML}]$

y $\text{Li}_2[\text{Ni-bpyTAML}]$ cuyo ion molecular se encuentra casi en el mismo valor), y el análisis elemental correspondió a la estructura propuesta para el complejo de níquel calculado considerando 2 moléculas de agua.

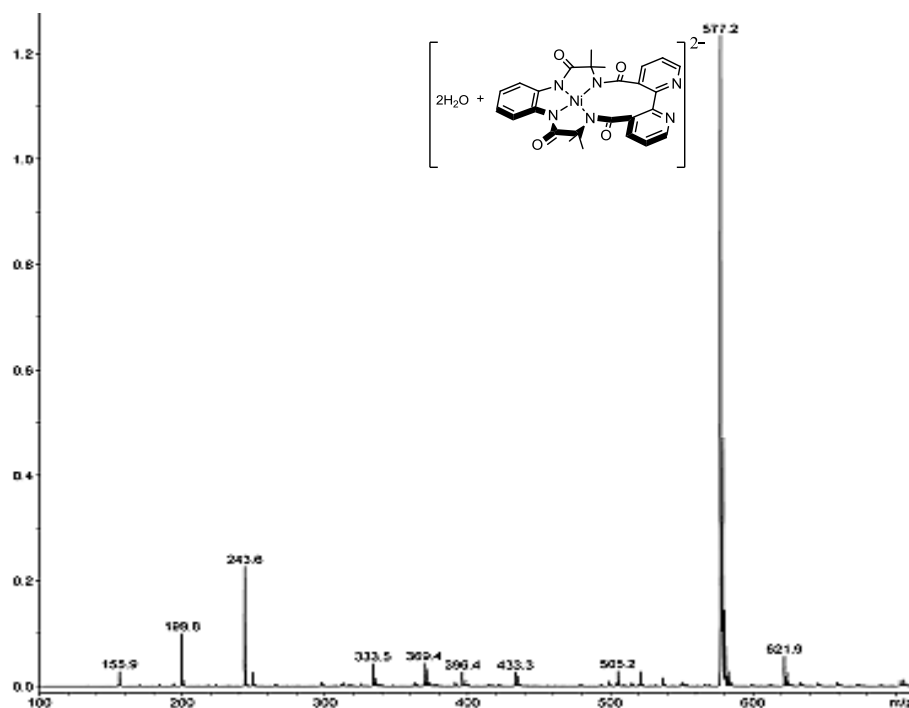


Figura 7.4. Espectro de masas ESI^- del complejo Ni-bpyTAML

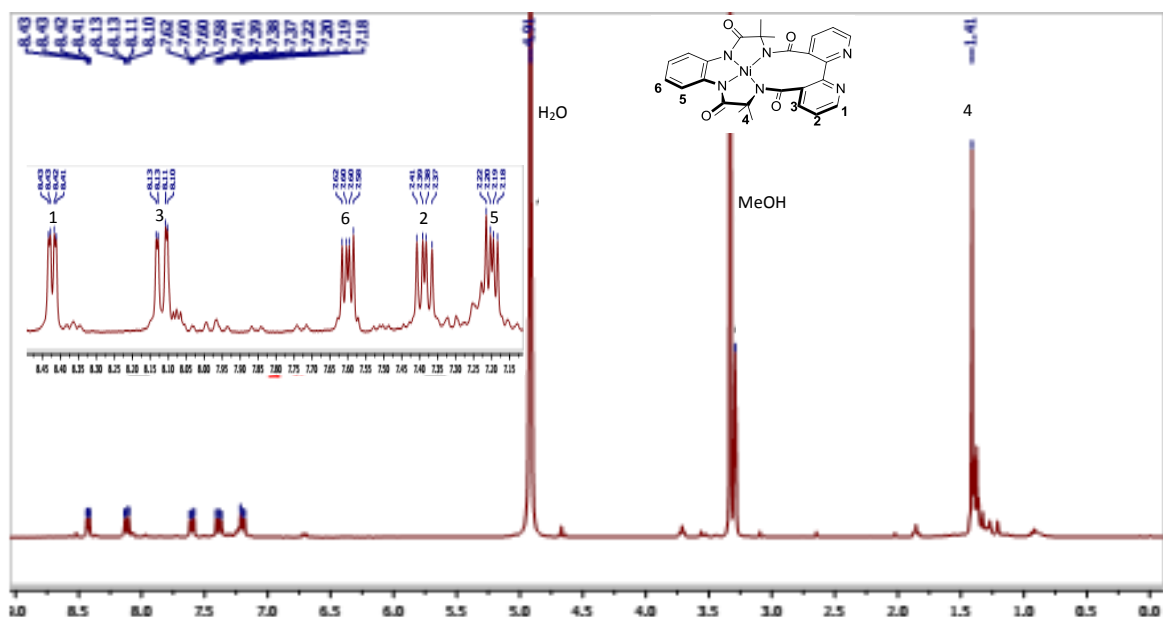


Figura 7.5. Espectro de RMN ^1H en CD_3OD del complejo Ni-bpyTAML

En el espectro de EPR no se observan señales por lo que se cree que se trata de una especie diamagnética. Para que esta condición se cumpla, se propone un complejo tetracoordinado de bajo spin con una estructura plana de cuadrado y donde el metal debe encontrarse como Ni^{II} . Este es un resultado inesperado ya que los Ni-TAML sintetizados anteriormente son especies de Ni^{III} .¹⁰

El hecho que el metal no se oxidó, quiere decir que la densidad electrónica que el níquel recibe por parte del ligante bpyTAML es menor comparada con otros TAML's. Este comportamiento puede explicarse debido al efecto electroatractor de los anillos de piridina que retiran densidad electrónica de la cavidad central donde se enlaza el metal.

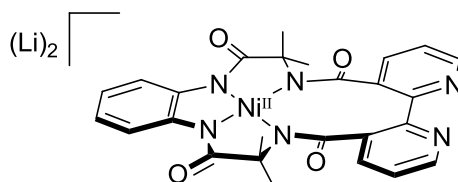
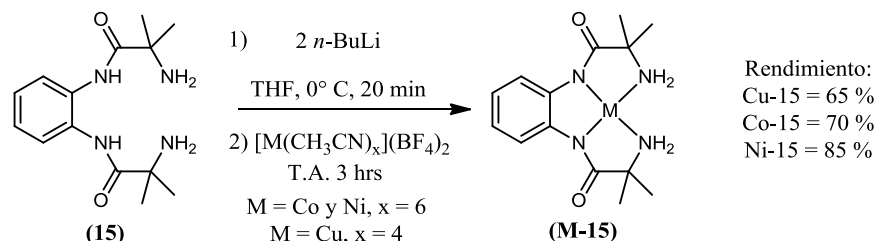


Figura 7.6. Estructura propuesta para el complejo Ni-bpyTAML

7.2. Descomposición de M-bpyTAML y síntesis de complejos M-15

Durante la manipulación de los complejos $\text{Li}[\text{Co}^{\text{III}}\text{-bpyTAML}]$ y $\text{Li}_2[\text{Ni}^{\text{II}}\text{-bpyTAML}]$ fue posible observar la descomposición de los mismos. Específicamente, al tratar de purificarlos mediante columnas cromatográficas se recuperaron en pequeñas cantidades productos que corresponden a la hidrólisis de los M-bpyTAML. Por un lado se recuperó y caracterizó el fragmento $\text{Bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2$ y por otro lado se encontraron complejos metalados con el ligante **15** similar a lo ocurrido en la metalación del bpyTAML con cobre.

Para comprobar la estructura de estos fragmentos se llevó a cabo la metalación del compuesto **15**, disolviendolo en THF y usando solo 2 equivalentes de *n*-BuLi para desprotonar las 2 amidas. Posteriormente, se adicionó el respectivo complejo $[\text{M}(\text{CH}_3\text{CN})_x](\text{BF}_4)_2$.



Reacción 7.2. Metalación del compuesto 15.

En caso de Fe no fue posible caracterizar ningún complejo debido a que el producto se descompuso rápidamente durante la purificación.

7.2.1. Complejo Cu-15

Cuando se adicionó el precursor de cobre (azul) a la mezcla de reacción se observó la formación de un precipitado marrón. Este producto fue purificado mediante cromatografía en columna de sílica eluida con metanol. El complejo **Cu-15** es una especie paramagnética de Cu^{II} ya que en RMN no se observan señales definidas, y en EPR se obtuvo un espectro anisotrópico con $A_{\parallel} = 21.93$ mT correspondiente a un complejo de Cu^{2+} con geometría plana.¹¹ Mediante una simulación se pudo obtener un valor para el $shfcc = 1.45$ mT. En el espectro de masas se detectó el ión molecular $[\text{Cu-15}]^+$ en 339 m/z donde el patrón isotópico indica la presencia de cobre (anexo A10), y el análisis elemental concuerda con la estructura propuesta para el complejo y se obtuvieron cristales apropiados para la difracción de rayos X de monocristal.

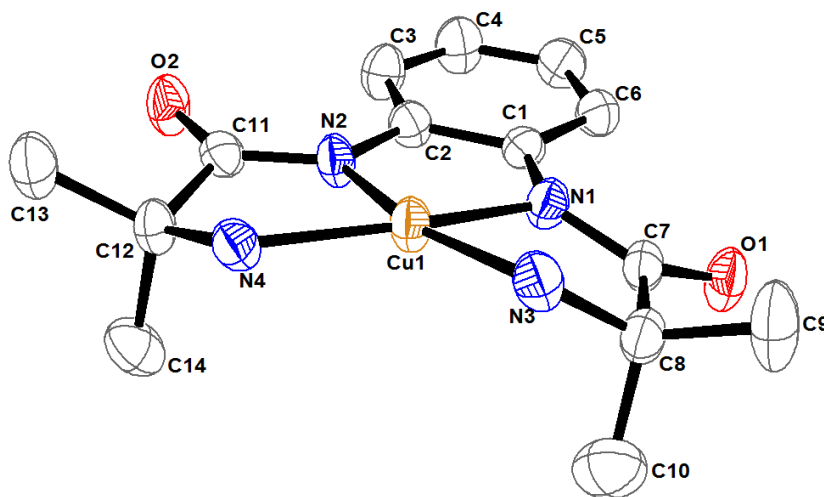


Figura 7.7. Estructura del complejo Cu-15 obtenida a través de difracción de rayos X de monocristal, para mayor claridad se han omitido los hidrógenos de la molécula

7.2.2. Complejo Co-15

Bajo el mismo esquema se llevó a cabo la metalación de **15** con cobalto. Una vez que se adicionó el precursor de cobalto en la reacción se observó la formación de un precipitado naranja. Durante la purificación, este precipitado fue disuelto en metanol e inmediatamente se observó un cambio de color a verde. El producto se purificó por cromatografía en

columna y se cristalizó por evaporación lenta de metanol. En el espectro de RMN ^1H se observan las señales en 8.72 ppm y 6.91 ppm asignadas al anillo aromático. Debido a la influencia electrónica del metal estas señales aparecen a desplazamientos químicos muy diferentes, comparado con el ligante libre. También se tiene una señal alifática que se asignó a los metilos en 1.44 ppm (anexo A11). En espectrometría de masas se observa el ion molecular $[\text{Co-15}]^+$ a 333 m/z que cuenta con el patrón isotópico esperado por la presencia de cobalto (anexoA 12). El análisis elemental corresponde a la estructura propuesta para el complejo con la adición de 5 moléculas de agua. Esto concuerda con el resultado obtenido por difracción de rayos X en donde se observa que el metal tiene una molécula de agua coordinada y un hidroxilo en las posiciones axiales. También se observa que el complejo cristaliza con 3 moléculas de agua.

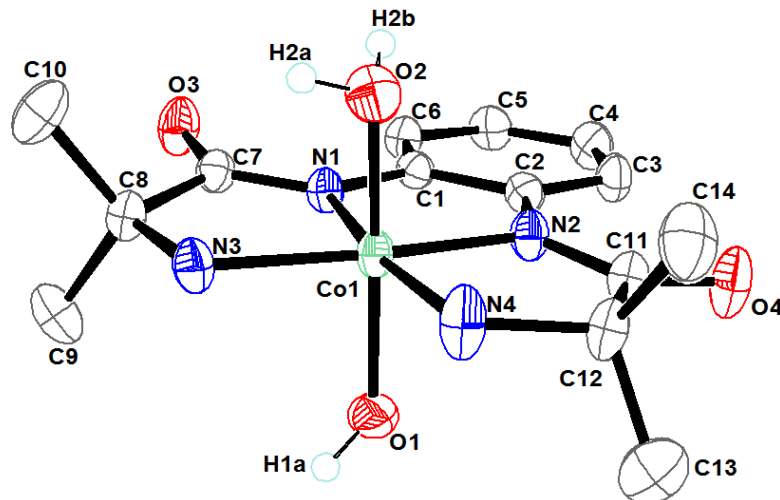
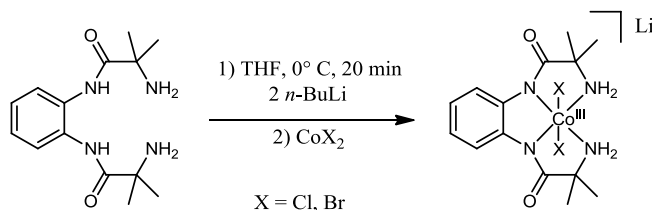


Figura 7.8. Estructura del complejo Co-15 obtenida a través de difracción de rayos X de monocristal, para mayor claridad se omitieron los hidrógenos de la molécula, con excepción de los ligantes axiales.

El complejo **Co-15** es neutro y tiene una estructura octaédrica. En el espectro de EPR no se observó señal alguna por lo que se plantea como una especie diamagnética de Co^{III} , esto coincide con la estructura obtenida en la cual el metal está enlazado covalentemente a las 2 amidas y el hidroxilo, confiriendo el estado de oxidación 3+. La oxidación del metal y la formación del enlace Co-OH ocurren al disolver el complejo en metanol, se propone que el primer complejo de color naranja es de Co^{II} y altamente reductor, que al entrar en contacto con las moléculas de agua disueltas en el MeOH, se produce la oxidación del metal y la hidrólisis del agua formando el enlace M-OH, formando H_2 .

Recientemente el Dr. Gosh informó la síntesis de complejos muy similares de cobalto (con el mismo ligante), en su caso partiendo de sales CoX_2 , en estos, el centro metálico conserva los ligantes X del precursor y el metal se oxida a Co^{III} obteniendo especies anionicas, estos complejos han sido usados exitosamente como catalizadores en la adición de CO_2 a epóxidos.¹²



Reacción 7.3. Síntesis de complejos similares a Co-15 informados.

El complejo **Co-15** se disolvió en metanol y se adicionaron 2 equivalentes de DMAP, inmediatamente se observó un cambio de color de la disolución de verde a café. El producto se caracterizó por RMN ^1H , en su espectro se observa que solamente una molécula de DMAP se coordinó en posición axial, ya que se hay 3 señales alifáticas de los grupos metilo de la molécula; una en 5.5 ppm asignada a los metilos de la DMAP coordinada y las otras 2 señales en 1.3 y 0.7 ppm asignadas los metilos de la estructura principal del ligante que ahora son diastereotópicos por la incorporación del ligante en una cara del complejo.

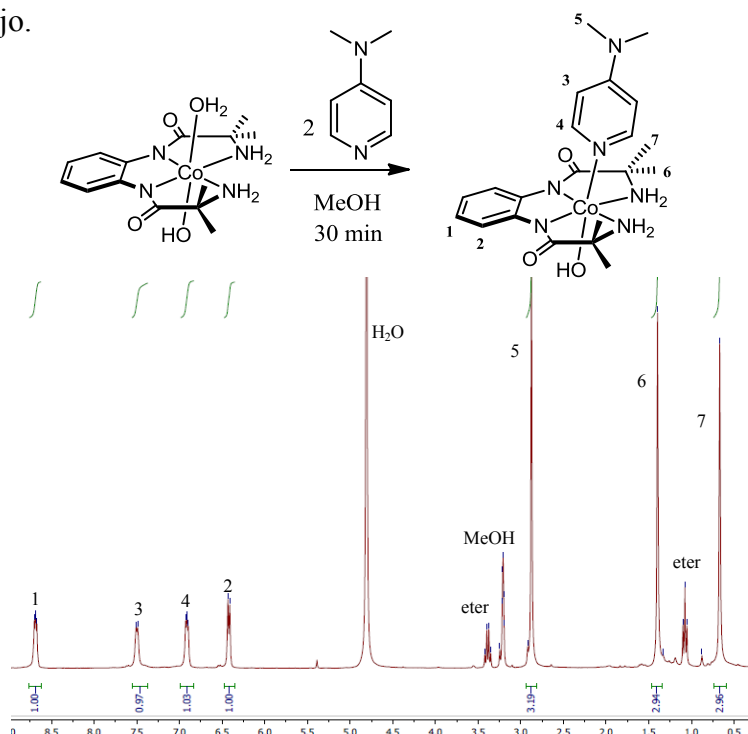


Figura 7.9. Reacción entre Co-15 y DMAP y RMN ^1H del producto obtenido

7.2.3. Complejo Ni-15

La metalación de **15** con níquel se llevó a cabo bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Después de adicionar el precursor de níquel de color azul, se obtuvo un sólido amarillo que fue caracterizado por RMN ^1H donde se observan 2 señales para los hidrógenos del anillo aromático en 8.01 y 6.63 ppm y una señal de los 4 metilos alifáticos en 1.32 ppm. En espectrometría de masas se observa el ion molecular en 334 m/z (anexo A13) y el análisis elemental corresponde con la estructura propuesta con la adición de una molécula de agua. Además fue posible obtener cristales apropiados para la difracción de rayos X.

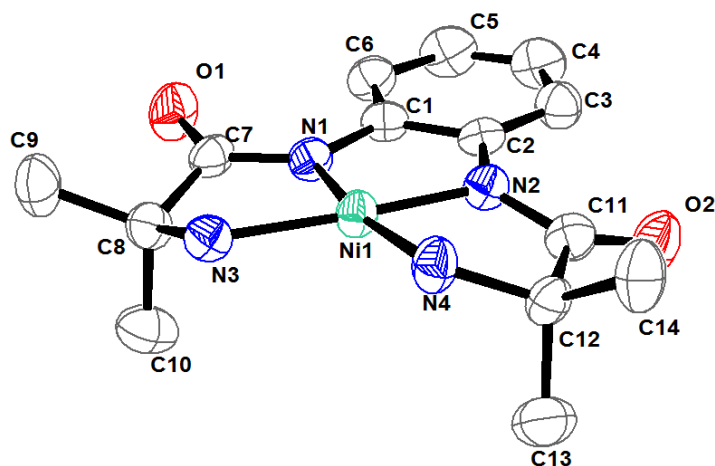


Figura 7.10. Estructura del complejo Ni-15 obtenida a través de difracción de rayos X de monocristal, se han omitido los hidrógenos de la molécula para mayor claridad.

En la estructura se puede observar que se trata de un complejo tetracoordinado con geometría cuadrado plano, es neutro y el metal se encuentra como Ni^{II} .

Distancia (Å)	Cu-15	Co-15	Ni-15	Ángulo (°)	Cu-15	Co-15	Ni-15
M-N _{amida1}	1.914	1.873	1.824	N1-M-N2	83.28	85.82	85.96
M-N _{amida2}	1.913	1.871	1.825	N3-M-N4	109.96	104.84	103.75
M-N _{amina3}	1.981	1.990	1.913	N1-M-N3	82.48	84.46	85.72
M-N _{amina4}	2.001	1.963	1.914	N2-M-N3	165.21	170.23	171.54
M-OH		1.883		O-M-N1		91.53	
M-O _{agua}		1.957		O-M-N3		87.32	
				O-M-OH		176.02	

Tabla 7.1. Distancias y ángulos de enlace obtenidos a partir de difracción de rayos X de monocristal para los complejos Cu-15, Co-15 y Ni-15.

En la tabla 7.2 se encuentran los parámetros cristalográficos con los que se obtuvo la difracción de rayos X para los complejos Cu-15, Co-15 y Ni-15

Parámetro	Cu-15	Co-15	Ni-15
formula empírica	C ₁₄ H ₂₂ CuN ₄ O ₃	C ₁₄ H ₃₀ CoN ₄ O ₇	C ₂₉ H ₄₄ N ₈ Ni ₂ O ₅
peso formula	362.96	431.47	702.14
temperatura (K)	298	298	298
longitud de onda (Å)	0.71073	0.71073	0.71073
sistema cristalino	monoclínico	Ortorrómbico	Monoclínico
grupo espacial	P2 ₁ /c	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	C 2/c
dimensiones de la celda unitaria en (Å y °)	$a = 11.0543$ $\alpha = 90$ $b = 11.5034$ $\beta = 94.146$ $c = 25.9212$ $\gamma = 90$	$a = 110.7580$ $\alpha = 90$ $b = 11.4431$ $\beta = 90$ $c = 15.6042$ $\gamma = 90$	$a = 25.4614$ $\alpha = 90$ $b = 11.4376$ $\beta = 93.928$ $c = 22.3971$ $\gamma = 90$
volumen (Å ³)	3287.57	1920.95	6507.1
Z	8	4	8
densidad (mg/m ³)	1.467	1.492	1.433
coeficiente de absorción (mm ⁻¹)	1.348	0.939	1.207
F(000)	1518	914	2960
tamaño del cristal (mm)	0.344 x 0.187 x 0.080	0.342 x 0.156 x 0.138	0.274 x 0.171 x 0.080
Color	naranja / prisma	azul / prisma	amarillo / placas
rango θ de colección de datos (°)	2.370 a 27.471	2.207 a 27.475	2.178 a 27.499
rango de índices	$-13 \leq h \leq 14$ $-14 \leq k \leq 14$ $-33 \leq l \leq 18$	$-13 \leq h \leq 13$ $-14 \leq k \leq 14$ $-20 \leq l \leq 14$	$-32 \leq h \leq 32$ $-14 \leq k \leq 14$ $-29 \leq l \leq 28$
reflexiones colectadas	21402	12633	21754
reflexiones independientes	7513 [R(int) = 0.0892]	4413 [R(int) = 0.02663]	7453 [R(int) = 0.0897]
corrección de absorción	semi-empírica de equivalente	semi-empírica de equivalente	semi-empírica de equivalente
método de refinamiento	cuadrados mínimos	cuadrados mínimos	cuadrados mínimos
datos/restricciones/parámetros	7513 / 43 / 457	4413 / 55 / 295	7453 / 29 / 433
calidad de ajuste en F^2	0.984	1.053	0.998
índices finales $R[I > 2\sigma(I)]$	$R1 = 0.0555$, $wR2 = 0.1234$	$R1 = 0.0286$, $wR2 = 0.0660$	$R1 = 0.0610$, $wR2 = 0.1073$
índices R (todos los datos)	$R1 = 0.1073$, $wR2 = 0.1539$	$R1 = 0.0328$, $wR2 = 0.0684$	$R1 = 0.1313$, $wR2 = 0.1384$
máximo-mínimo de densidad electrónica residual (eÅ ⁻³)	0.621 y -0.639	0.235 y -0.356	0.682 y -0.567

Tabla 7.2. Parámetros cristalográficos para Cu-15, Co-15 y Ni-15

7.3. Reacciones para formar el complejo bimetálico.

El último paso de la síntesis del complejo bimetálico consistió en la unión del complejo de rutenio y el bpyTAML o bien el M-bpyTAML, como se presentó anteriormente en los esquemas 5.1 y 5.4 del capítulo 5. La formación del sistema bimetálico se planteó por coordinación mediante un intercambio de ligantes o por la condensación entre ácidos carboxílicos y aminas para la formación de las amidas del ligante.

7.3.1. Sistema bimetalico por intercambio de ligantes

En estas reacciones se utilizaron los complejos de rutenio **2-5** (síntesis ver capítulo 5) con ligantes lábiles para permitir el intercambio de ligantes con el bpyTAML.

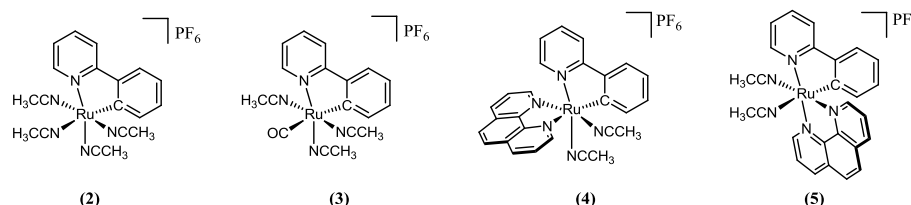
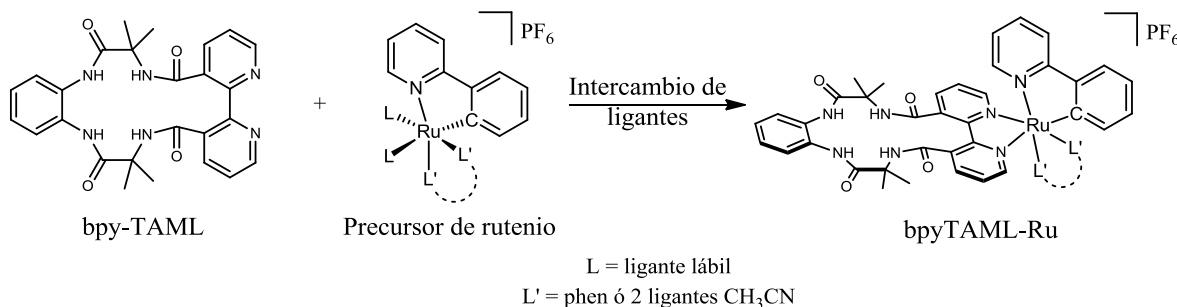


Figura 7.11. Precursores de rutenio usados para coordinar el ligante bpyTAML

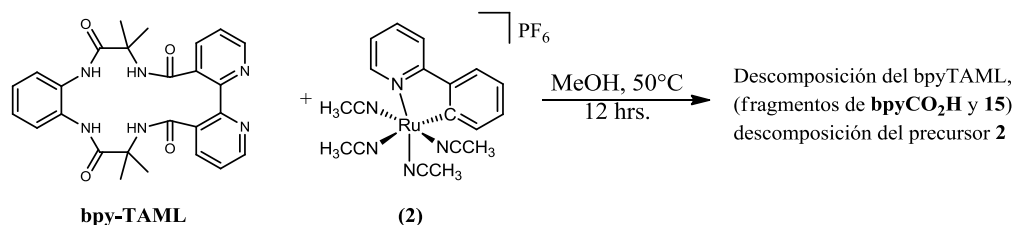
La propuesta fue coordinar el ligante bpyTAML directamente al rutenio por los nitrógenos *N*-piridínicos, para formar el complejo bpyTAML-Ru y posteriormente llevar a cabo la metalación del bpyTAML para obtener el complejo bimetalico. De manera general todas estas reacciones presentaron dificultades durante la purificación debido a la baja solubilidad y la poca estabilidad del ligante bpyTAML.



Esquema 7.6. Formación del bpyTAML-Ru por intercambio de ligantes

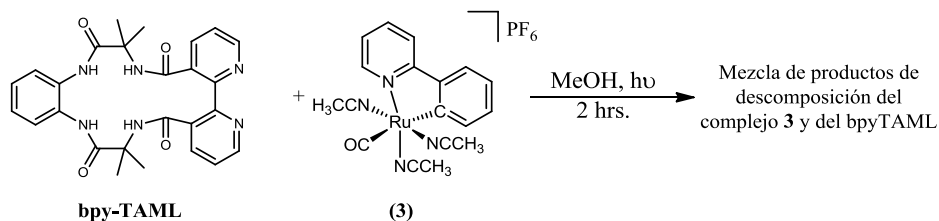
La reacción entre el complejo **2** y el bpyTAML se llevó a cabo disolviendo los reactivos en metanol y calentando a 50 °C. Se observó un cambio de color de amarillo a púrpura, lo que indicaba que la bipyridina del bpyTAML se coordinaba al rutenio. Sin embargo, por RMN ¹H, se observó una mezcla de productos de descomposición tanto del complejo **2** como del bpyTAML, que además incluía la coordinación de fragmentos de descomposición al rutenio. Esta mezcla no fue posible separarla debido que la interacción con columnas cromatográficas (de alúmina y sílica) promovía la hidrólisis del ligante bpyTAML.

Para la reacción anterior también se usaron diferentes proporciones de mezclas metanol:acetonitrilo a fin de disminuir la descomposición del complejo **2** y al mismo tiempo evitar la coordinación de un segundo ligante bpyTAML. Sin embargo, la adición de acetonitrilo como disolvente provocó la competencia entre éste y el ligante bpyTAML por la coordinación al metal, lo que concluyó en una reacción mucho más lenta donde finalmente no se pudo impedir la descomposición de los reactivos obteniéndose mezclas similares al caso anterior.



Reacción 7.4. Reacción entre bpyTAML y 2

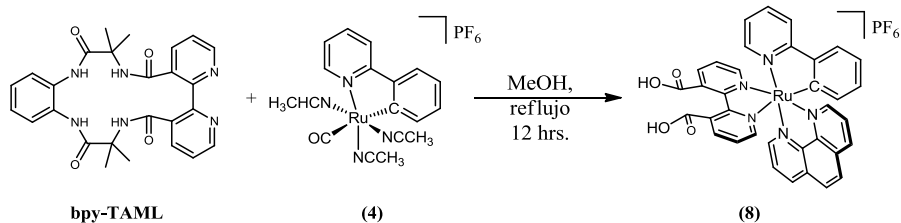
Como alternativa para evitar la descomposición del precursor de rutenio durante la reacción y facilitar la purificación, se utilizó entonces el precursor de rutenio **3**. Este complejo de mayor estabilidad que **2** había mostrado una baja reactividad frente a la sustitución de ligantes usando **phen** (la sustitución de dos ligantes monodentados no se obtuvo, y solamente a reflujo de metanol se logró la sustitución de los 4 ligantes monodentados). Una variante en esta reacción fue mediante irradiación ultravioleta para impulsar la descoordinación del CO y permitir así la sustitución del ligante. Sin embargo, la irradiación UV también produjo la descomposición de los reactivos obteniéndose mezclas de productos que no pudieron ser resueltas.



Reacción 7.5. Reacción por irradiación de luz UV entre bpyTAML y 3.

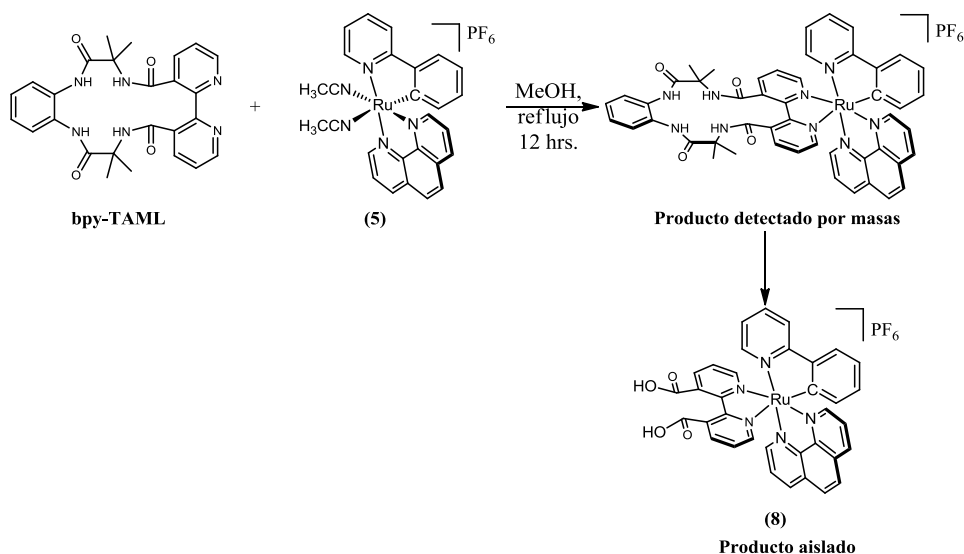
El complejo **4** presenta una reactividad muy similar a la encontrada para el complejo **3** (debido a su estabilidad el intercambio de ligantes solo ocurre a temperaturas mayores a 60

°C),¹³ por tanto la reacción se llevó a cabo a reflujo de metanol, pero tales condiciones produjeron la hidrólisis del bpyTAML y como resultado se obtuvo el complejo **8**, en donde se coordinó al metal el fragmento **bpyCO₂H** proveniente de la hidrólisis del bpyTAML.



Reacción 7.6. Reacción entre bpyTAML y 4.

El complejo **5** es mucho más reactivo hacia la sustitución de ligantes porque un acetonitrilo es muy lábil debido a la influencia *trans* del enlace organometálico, lo que trae consigo una baja estabilidad del complejo.¹⁴ En este caso la reacción se llevó a cabo en metanol y mezclas metanol:CH₃CN a 50 °C, pero por su baja estabilidad en disolución se produjo una gran descomposición del complejo, obteniéndose mezclas que no se pudieron separar similar a lo ocurrido con el complejo **2**. Al tomar una alícuota directamente del seno de reacción fue posible detectar a través de espectrometría de masas ESI⁺ el pico en 954 m/z, en particular para el caso de rutenio el patrón isotópico (7 isótopos naturales) indica que el metal se encuentra presente [M+MeOH]⁺, y corresponde a la coordinación del bpyTAML.



Esquema 7.7. Reacción entre bpyTAML y 5

RuL+ 120417122657 #14-32 RT: 1.11-2.59 AV: 19 SB: 5 0.45-0.78 NL: 5.08E6
T: + c Full ms [400.00-1200.00]

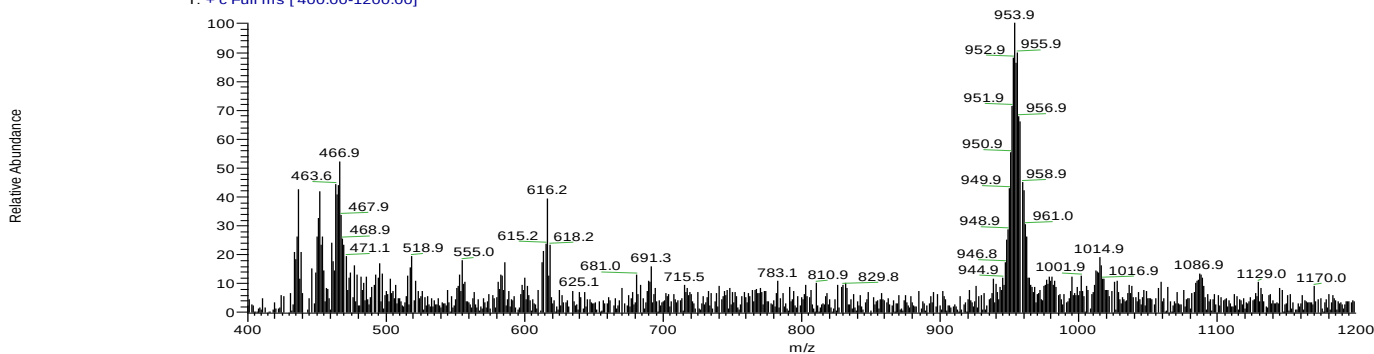


Figura 7.12. Espectrometría de masas ESI⁺ obtenida de la reacción entre **5** y bpyTAML

Las reacciones descritas anteriormente también se llevaron a cabo sustituyendo el ligante bpyTAML por los complejos Co-bpyTAML y Ni-bpyTAML, con objeto de formar directamente el complejo bimetalico y simplificar la purificación del producto (se esperaba la precipitación del mismo). Sin embargo, en estas reacciones no fue posible detectar la coordinación del M-BpyTAML al complejo de rutenio.

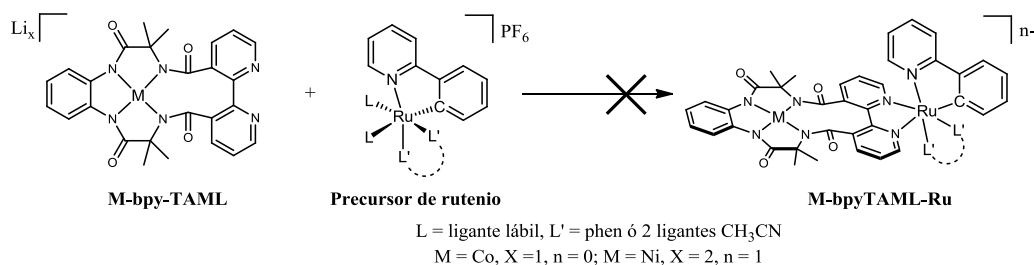


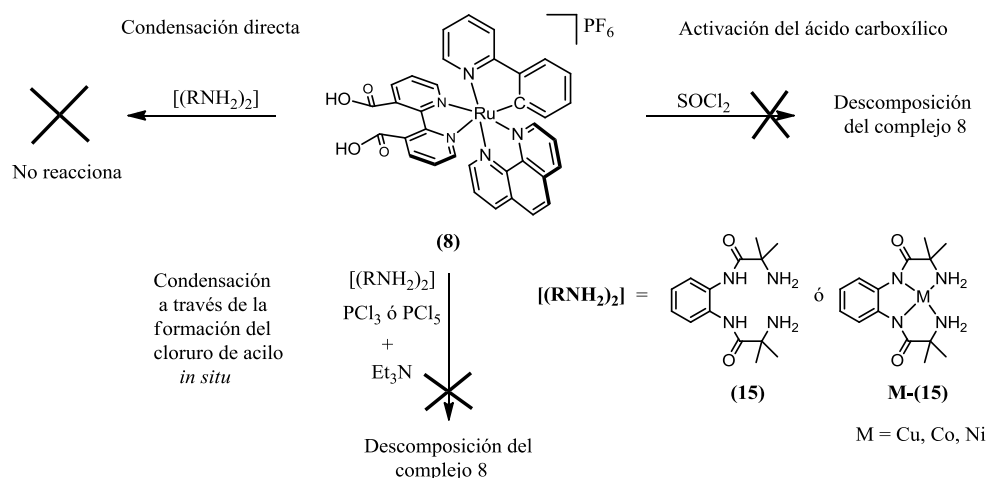
Figura 7.13. Reacciones entre M-bpyTAML y precursores de rutenio

7.3.2. Formación del complejo bimetalico por reacción de condensación

Para realizar la condensación que diera lugar al complejo bimetalico fue posible obtener el complejo **8** como precursor de rutenio, el cual cuenta con ácidos carboxílicos que permite la condensación con las aminas presentes en el compuesto **15**.

En primer lugar se intentó la condensación directa entre los compuestos **8** y **15** en reflujo de metanol y THF pero la reacción no procedió y se recuperaron los reactivos en forma cuantitativa. En una segunda aproximación se planteó activar los ácidos carboxílicos transformándolos en cloruro de acilo y de esta forma facilitar la condensación. Para formar el cloruro de acilo se disolvió el complejo en SOCl₂, sin embargo, encontramos que el

complejo de rutenio no resiste estas condiciones y se descompone al ser disuelto en SOCl_2 . Esto nos llevó a formar el cloruro de acilo *in situ* utilizando agentes halogenantes (PCl_3 y PCl_5) y bases para neutralizar el HCl que se formaría en la reacción, pero una vez más las condiciones provocaron la descomposición del complejo de rutenio. La reacción de condensación también se intentó utilizando los complejos **M-15** directamente con el complejo **8** a reflujo de metanol y THF recuperando nuevamente los reactivos en forma cuantitativa.



Esquema 7.7. Reacciones de condensación para formar el bpyTAML en el complejo 8.

7.4. Análisis del bpyTAML y M-bpyTAML mediante cálculos DFT

Con la colaboración del Dr. Longzhu Shen del *Mellon Institute* de la Universidad *Carnegie Mellon en Pittsburg PA.*, se llevaron a cabo cálculos DFT. Mediante estos cálculos se obtuvieron las conformaciones más probables para la estructura del bpyTAML.

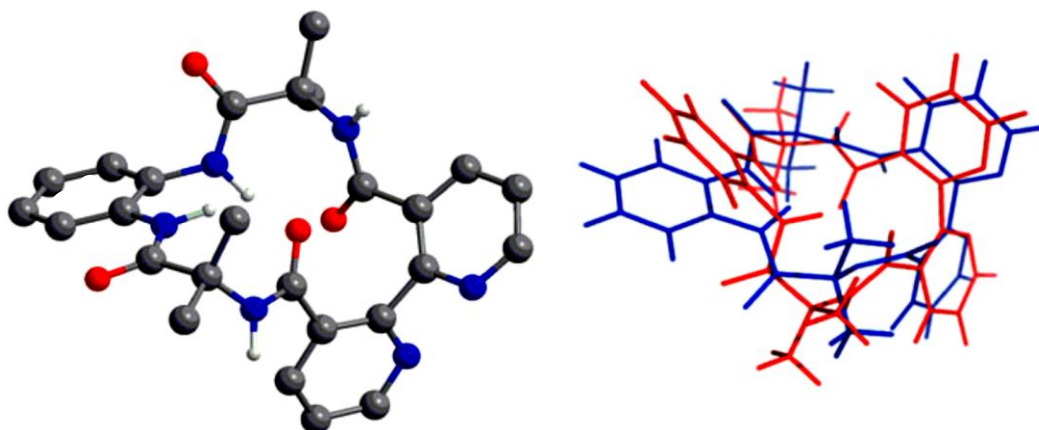


Figura 7.14. Estructura de BpyTAML obtenida mediante cálculos DFT en fase gas (derecha). A la izquierda la superposición de las estructuras obtenidas en fase gas (rojo) y en THF (azul)

En las estructuras presentadas en la figura 7.14, se observa que en las conformaciones más estables adoptadas por el bpyTAML, los hidrógenos no son equivalentes (esto es aún más evidente sobre los grupos metilo). Sin embargo, en la RMN ^1H del ligante (discutida en la sección 6.2) solamente se observa una señal de hidrogeno para todos los grupos metilo. Una rápida interconversión entre las diferentes conformaciones del ligante (similar a lo que ocurre con el ciclohexano),^{15,16} puede explicar este fenómeno, es decir, que en RMN ^1H no se observen hidrógenos diastereoisotópicos, lo que también es consistente con las señales correspondientes a los hidrógenos aromáticos y los espectros de RMN ^{13}C .

En la figura 7.13 también observamos que para las conformaciones más estables, solo 2 de los 4 nitrógenos *N*-amido se encuentran en el centro de la cavidad del bpyTAML (cabeza), mientras que los otros 2 *N*-amido (cola) se encuentran en la parte exterior de la estructura. Esta conformación de la estructura del bpyTAML permite explicar la dificultad que se tiene para enlazar un metal en su cavidad central, puesto que para formar los 4 enlaces *N*-amido es necesario que el ligante adquiriera una configuración de menor estabilidad.

También podemos observar en la estructura que entre los 2 anillos de piridina se forma un ángulo de aproximadamente 80° , esto provoca que las *N*-piridinas no se encuentren en la posición adecuada (coplanares), para coordinar un metal como quelato bidentado. Cuando se formó el complejo bpyTAML-Ru (sección 7.3.1.) forzando las posiciones de las 2 piridinas en forma de quelato, el complejo resultó muy inestable producto de la tensión sobre la estructura cíclica. Sobre todo en los grupos amida de la cola, por lo que el complejo sufrió una rápida hidrólisis, al punto que solo fue posible detectar esta especie coordinada pero no pudo ser aislada ni caracterizada.¹⁶



Figura 7.15. Conformación del fragmento de bipyridina

También se realizaron cálculos DFT para el complejo Co-bpyTAML. Estos cálculos se basaron en datos experimentales obtenidos de la estructura del complejo Co-TAML informado en la literatura anteriormente.¹⁷ En este caso se estudiaron 3 posibles estructuras del complejo metalado variando el número de coordinación alrededor del átomo metálico: tetracoordinado (A), pentacoordinado (B) con una molécula de agua coordinada al metal en posición axial y hexacoordinado (C) con 2 moléculas de agua coordinadas de manera axial, así como sus respectivas energías.

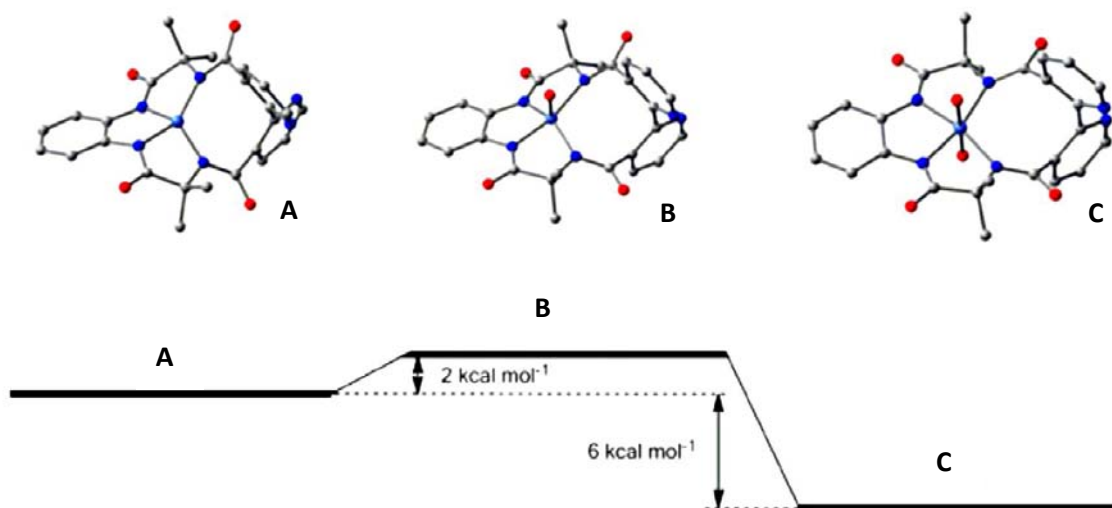


Figura 7.15. Conformaciones más estables obtenidas por cálculos DFT para el complejo Co-bpyTAML en los 3 modos de coordinación posibles: tetracoordinado (A), pentacoordinado (B) y hexacoordinado (C)

En la figura 7.15 se observa que en la estructura tetracoordinada la configuración del centro metálico corresponde a un cuadrado plano altamente distorsionado, incluso se aproxima a la estructura tetraédrica, mientras que la estructura pentacoordinada es una pirámide de base cuadrada y en la estructura hexacoordinada se tiene un octaedro ligeramente distorsionado.

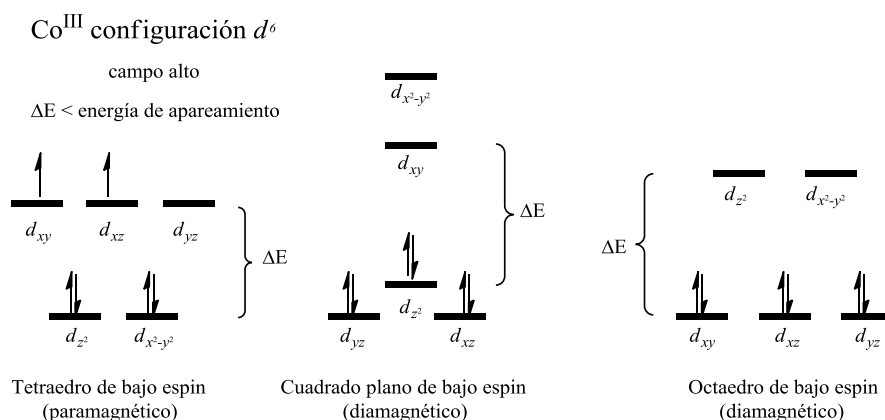
En la siguiente tabla se presentan las distancias de enlace Co-N-amido para el modelo utilizado y las 3 estructuras obtenidas a través de los cálculos DFT.

Enlace Co-N-amido	Modelo	Tetraordinado	Pentacoordinado	Hexacoordinado
Distancia Å (cabeza)	1.82	1.85	1.85	1.91
Distancia Å (cola)	1.83	1.91	2.02	2.02

Tabla 7.3. Distancias de enlace Co-N de las estructuras del Co-bpyTAML

En la tabla 7.3 podemos observar que en el Co-TAML usado como modelo las distancias Co-N son casi iguales. Para la estructura pentacoordinada se observa la mayor diferencia entre las distancias Co-N de la cabeza y la cola mientras la estructura con la menor diferencia de distancias corresponde a la tetraordinada. Aunado a esto, en la figura 7.14 se observa que la estructura menos favorecida energéticamente es la pentacoordinada, por tanto esta configuración resulta poco probable para nuestra molécula. En lo que respecta a la la estructura más estable energéticamente, la figura 7.14 muestra que corresponde a la hexacoordinada. Además en esta configuración se observa la mayor simetría de la molécula, lo cual concuerda con el espectro de RMN ^1H donde no se observan hidrógenos diastereotópicos.

Analizando la estructura tetraordinada y hexacoordinada mediante la teoría de campo cristalino, encontramos que una estructura tetraédrica de Co^{III} es paramagnética, y solamente en un caso extremo con estructura de cuadrado plano de bajo espín (campo fuerte), resulta en una especie diamagnética. Mientras que para la estructura hexacoordinada el caso de configuración octaédrica de bajo espín es una especie diamagnética.



Esquema 7.8. Desdoblamiento de orbitales según la teoría de campo cristalino para estructura tetraédrica, cuadrado plano y octaédrica

Tomando en cuenta que el complejo Co-bpyTAML es diamagnético y que la geometría simulada para la estructura tetracoordinada es más cercana a la tetraédrica además de que es inusual encontrar ejemplos de compuestos tetracoordinados, podemos concluir que nuestro complejo debe tratarse de un compuesto con geometría octaédrica de Co^{III} , en cuyas posiciones axiales se encuentran coordinadas 2 moléculas de disolvente.

Analizando cuidadosamente las estructuras obtenidas por los cálculos DFT del complejo Co-bpyTAML, encontramos que en las 3 conformaciones se forma un ángulo de aproximadamente 80° entre los anillos piridínicos (similar a lo que ocurre con el ligante libre, figura 7.11) evitando que se encuentren en la posición adecuada para enlazar al segundo metal como un quelato bidentado. Cabe mencionar que a diferencia del ligante libre, el complejo metalado posee menos grados de libertad por los enlaces Co-N y resulta prácticamente imposible que los anillos piridínicos adquieran la posición adecuada para formar el quelato bidentado. Debido a esto, en las reacciones para obtener el compuesto bimetalico, nunca se pudo detectar el complejo esperado y como producto podíamos observar la demetalación del complejo M-bpyTAML o la fragmentación del mismo ¹⁸

7.5. Parte experimental.

Los cálculos DFT se hicieron en Gaussian 09 rev.B.01¹⁹ usando el parámetro híbrido funcional Becke's three (B3)^{20,21} y correlación de Lee-Yang-Parr (LYP)²² con set base 6-311G. Este enfoque ha sido muy confiable para los TAML's.²³ Las geometrías para el Co-bpyTAML fueron obtenidas por optimización completa en fase gaseosa hasta cumplirse los criterios de convergencia. El modelo inicial de Co-bpyTAML fue desarrollado usando los datos de difracción de rayos X informados anteriormente para el complejo Co^{III} -TAML.²⁴ se calcularon múltiples conformeros, pero se informan solo los de menor energía. Para el ligante bpyTAML se hicieron los cálculos en fase gas y en disolución en THF invocando el modelo implícito de solvente continuo (SMD).²⁵

Los experimentos de EPR se realizaron en tubos de cuarzo en sólido y disueltos en metanol a 77 K en un dedo frío, en un equipo EPR JEOL JES-TE300 en banda X a 100 KHz de frecuencia de modulación con una cavidad cilíndrica del modo TE_{011} . La calibración del campo externo se hizo con Gaussómetro de precisión JEOL ES-FC5, con el programa de

adquisición ES-IPRINT y la simulación se realizó con el programa AniSimu/FA versión 2.4.0.

Síntesis de precursores metálicos $[M(CH_3CN)_x](BF_4)_2$, $M = Fe, Co$ y Ni , $x = 6$; y $M = Cu$, $x = 4$

Esta síntesis se llevó a cabo siguiendo el método reportado por B. J. Hathaway y A. E. Underhill.²⁶ En un matraz de Schlenk equipado con un escape de presión, se colocaron 8.5 mmol del metal en estado elemental, mediante cánula se agregaron 25 mL de CH_3CN seco. Cuidadosamente se adicionaron 16 mmol de $NOBF_4$, (se debe tener cuidado puesto que la reacción libera inmediatamente óxido de nitrógeno). El gas producido fue evacuado del sistema mediante la trampa de presión y salió a través de la campana de extracción. Aproximadamente 1 hora después se dejó de observar la formación de óxidos nitrosos. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 6 horas. Se filtró a través de celita bajo atmósfera inerte, se evaporó el disolvente al vacío y los productos se secaron al vacío por 24 horas y fueron almacenados bajo atmósfera inerte.

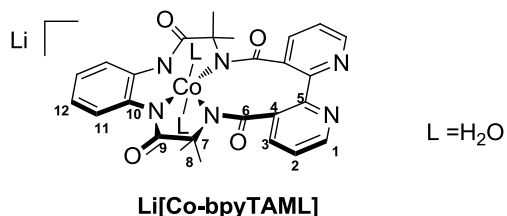
Compuesto	Color	Rend. (%)	IR ν -C-N (cm^{-1})	IR ν -BF ₄ (cm^{-1})
[Fe(CH ₃ CN) ₆](BF ₄) ₂	blanco	65	2314 y 2285	1000
[Co(CH ₃ CN) ₆](BF ₄) ₂	anaranjado	70	2320 y 2293	1001
[Ni(CH ₃ CN) ₆](BF ₄) ₂	azul	72	2325 y 2298	999
[Cu(CH ₃ CN) ₄](BF ₄) ₂	azul claro	80	2329, 2300 y 2275	1015

Metalación de bpyTAML, método general.¹

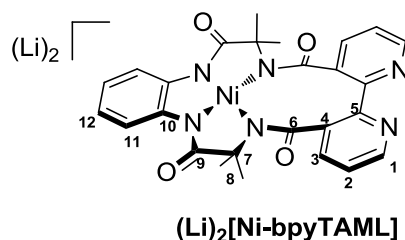
Una suspensión de 50 mg (0.1 mmol) de bpyTAML en 10 mL de THF se enfrió a 0 °C en baño de hielo. Se agregaron gota a gota 0.25 mL (0.4 mmol) de *n*-BuLi (1.6 M en hexano). La disolución se llevó a temperatura ambiente y se agitó por 20 minutos. El sólido se disolvió completamente y la disolución se tornó de color amarillo. Se enfrió nuevamente a 0 °C y se agregaron 0.1 mmol del precursor metálico $[M(CH_3CN)_6](BF_4)_2$. Se observó la formación de un precipitado y se mantuvo en agitación por 12 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se virtió sobre una columna cromatográfica cargada con celita, el producto fue lavado con THF y acetonitrilo, finalmente se eluyó con etanol. El

disolvente fue removido al vacío y el sólido resultante fue lavado con una mezcla de acetona/agua 9:1 y con éter etílico y secado al vacío.

Co-bpyTAML.²⁷ Sólido café, se obtuvieron 23 mg de producto. (Rendimiento 40 %). ¹H RMN (CD₃OD) δ: 8.76 (*dd*, 2 H, ²*J* = 5.8, ²*J* = 3.0, **H11**), 8.47 (*d*, 2 H, ²*J* = 3.6, **H1**), 8.15 (*br d*, 2 H, ²*J* = 7.5, **H3**), 7.44 (*br*, 2 H, **H2**), 6.95 (*dd*, 2 H, ²*J* = 5.8, ²*J* = 3.0, **H12**), 1.53 (*s*, 12 H, **H8**). ¹³C RMN (CD₃OD) δ: 179.98 (CO, **C9**), 173.38 (CO, **C6**), 157.65 (**C5**), 147.21(**C1**), 144.17 (**C10**), 136.65(**C3**), 135.47 (**C4**), 122.45 (**C2**), 122.13 (**C12**), 120.90 (**C11**), 56.91(**C7**), 27.95 (**C8**). IR (cm⁻¹): 1595 (CO), 1559 (CO). UV-Vis (MeOH), λ_{max} = 260 y 295 nm, ε = 12800 y 6100 M⁻¹cm⁻¹. ESI-MS (modo negativo) [M]⁻ = 577 *m/z*. Anál. elem. calculado para C₂₆CoH₂₂LiN₆O₄·4.5H₂O (%): C, 49.61; H, 4.96; N, 13.35. Encontrado: C, 49.78; H, 4.91; N, 13.05.



Ni-bpyTAML. Sólido amarillo se obtuvieron 25 mg de producto. (Rendimiento 45 %). ¹H NMR (CD₃OD) δ: 8.42 (*dd*, 2 H, ²*J* = 4.9, ³*J* = 1.6, **H1**), 8.11 (*dd*, 2 H, ²*J* = 7.7, ³*J* = 1.6, **H3**), 7.60 (*dd*, 2 H, ²*J* = 6.0, ²*J* = 3.5, **H11**), 7.38 (*dd*, 2 H, ²*J* = 7.7, ²*J* = 4.9, **H2**), 7.20 (*dd*, 2 H, ²*J* = 6.1, ²*J* = 3.5, **H12**), 1.41 (*s*, 12 H, **H8**). ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 178.08 (CO, **C9**), 173.17 (CO, **C6**), 157.89 (**C5**), 147.22 (**C1**), 136.79 (**C3**), 135.17 (**C10**), 130.79 (**C4**), 125.53 (**C12**), 124.26 (**C11**), 122.32 (**C2**), 54.83 (**C7**), 27.33 (**C8**). IR (cm⁻¹), 1650 (νCO) y 1597 (νCO). ESI-MS (modo negativo): [M]⁻ = 540 *m/z*. Anal. elem. para C₂₆NiH₂₂Li₂N₆O₄·4.5CH₃OH: C, 52.39; H, 5.77; N, 12.02. encontrado: C, 52.09; H, 5.49; N, 12.58.



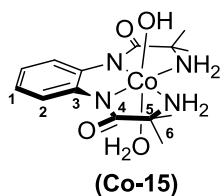
Metalación de **15** (*N,N'*-(1,2-fenilen)bis(2-amino-2-metilpropanamida))

Método general

Una disolución de 100 mg, (0.36 mmol) de **15** en 10 mL de THF se enfrió a 0 °C en baño de hielo, se agregaron gota a gota 0.45 ml (0.72 mmol) de *n*-BuLi (1.6 M en hexano). La mezcla se llevó a temperatura ambiente y se agitó durante 20 minutos. Se observó la formación de un precipitado blanco, la mezcla se enfrió nuevamente a 0 °C y se agregaron 0.36 mmol del precursor metálico [M(CH₃CN)_x](BF₄)₂. Se observó la formación de un precipitado cuyo color dependía del metal utilizado. La reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 12 horas. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna de sílica. Los productos se eluyeron con metanol y se cristalizaron por evaporación lenta del disolvente.

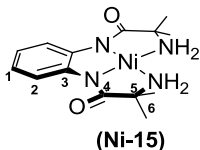
Co-15. Cristales verdes. (Rendimiento 70 %).

¹H NMR (CD₃OD) δ: 8.72 (*dd*, 2 H, ²*J* = 6.0, ³*J* = 3.5, **H2**), 6.91 (*dd*, 2 H, ²*J* = 6.0, ³*J* = 3.5, **H1**), 1.44 (*s*, 12 H, **H6**). ¹³C NMR (CD₃OD) δ: 179.49 (CO, **C4**) 141.34 (**C3**), 121.23 (**C1**), 119.32 (**C2**), 62.43 (**C5**), 26.25 (**C6**). IR(cm⁻¹): 3280 (NH₂), 1597 (CO), 1556 (CO). ESI-MS (modo negativo): [M]⁻ = 335 *m/z*. Anal. Elem. para C₁₄CoH₂₃N₄O₄·3H₂O: C, 39.63; H, 6.89; N, 13.20, encontrado: C, 40.53; H, 7.06; N, 13.24.



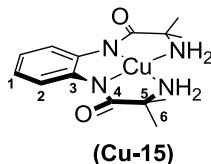
Ni-15. Cristales amarillos. (Rendimiento 85 %).

^1H NMR (CD_3OD) δ : 8.01 (*dd*, 2 H, $^2J = 6.0$, $^3J = 3.4$, **H2**), 6.63 (*dd*, 2 H, $^2J = 6.0$, $^3J = 3.4$, **H2**), 1.32 (*s*, 12 H, **H6**). ^{13}C NMR (CD_3OD) δ : 180.49 (CO, **C4**) 143.13 (**C3**), 121.62 (**C2**), 119.31 (**C1**), 62.14 (**C5**), 26.61 (**C6**). IR (cm^{-1}): 3223, 3148 (NH_2), 1592 (CO), 1557 (CO). ESI-MS (modo negativo): $[\text{M}]^- = 335$ *m/z*. Anal. elem. para $\text{C}_{14}\text{NiH}_{20}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 47.63; H, 6.28; N, 15.87. encontrado: C, 47.65; H, 6.03; N, 15.40.



Cu-15. Cristales rojos. (Rendimiento 65 %).

EPR en disolución metanólica se obtuvo un espectro anisotrópico con $A_{\parallel} = 21.93$ mT, $g_{\parallel} = 2.1750$, $g_{\perp} = 2.04$, $shfcc = 1.45$ mT. IR (cm^{-1}): 3228, 3139 (NH_2), 1592 (CO), 1556 (CO). ESI-MS (modo negativo): $[\text{M}]^- = 339$ *m/z*. Anal. elem. para $\text{C}_{14}\text{CuH}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$: C, 49.47; H, 5.93; N, 16.48. encontrado: C, 49.19; H, 6.22; N, 15.82.



7.6. Referencias

1. Uffelman, E. S. *Ph. D. Thesis Macrocyclic Tetraamido-N Ligands that Stabilize High Valent Complexes of Chromium, Manganese, Iron, Cobalt, Nickel, and Copper*. California Institute of Technology. Pasadena, California, **1992**.
2. Gordon-Wylie S W.; Collins T.J., *U. S. Patent 6,051,704*, **2000**.
3. Collins, T. J.; Kimberly, I.; Kostka, L.; Miinck, E.; Uffelman, E. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5637.
4. Ghosh, A.; Tiago de Oliveira, F.; Yano, T.; Nishioka, T.; Beach, E. S.; Kinoshita, I.; Münck, E.; Ryabov, A. D.; Horwitz, C. P.; Collins, T. J. *J. Am. Chem Soc.* **2005**, *127*, 2505.

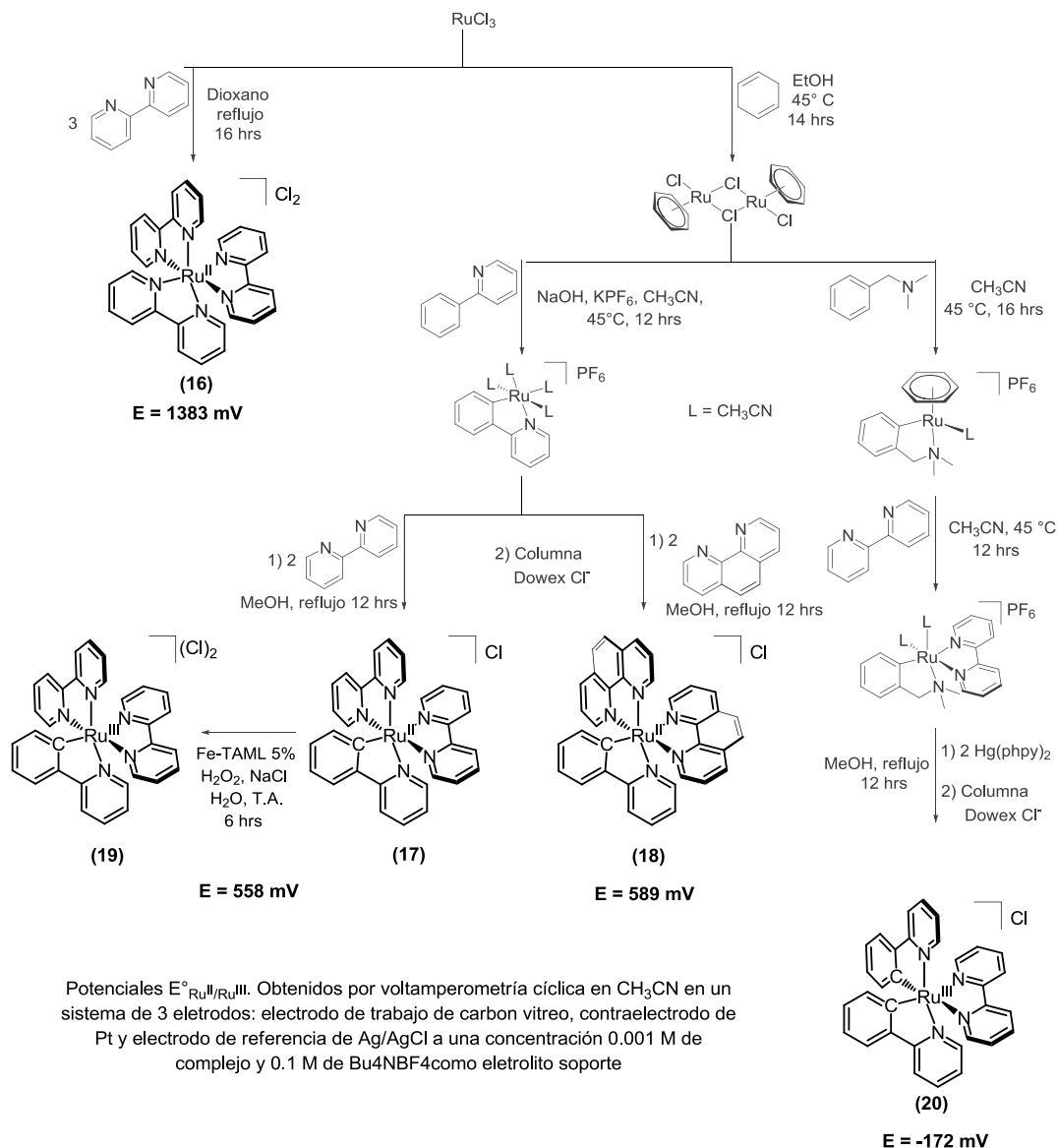
5. Gupta, K. K. A Textbook of Inorganic Chemistry, 9th Edition **2003**, New Age International Publishers, New Delhi, India.
6. C.P. Horwitz, A. Ghosh, *US Patent* 7,060,818, **2006**.
7. Anson, F. C.; Collins, T. J.; Richmond, T. G.; Santarsiero, B. D.; Toth, J. E.; Treco, B. G. R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2974.
8. Rybka, J. S.; Margerlm, D. W. *Inorg. Chem.* **1981**, *20*, 1453.
9. Collins, T. J.; Powell, R. D.; Slebodnick, C.; Uffelman, E. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8419.
10. Collins, T. J.; Nichols, T. R.; Uffelman, E. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4708.
11. Chikate. R. C.; Belapure, A. R.; Padhye, S. B.; West, D. X. *Polyhedron*, **2005**, *24*, 889.
12. Ramidi, P.; Gerasimchuk, N.; Gartia, Y.; Felton, C. M.; Ghosh, A. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 13151.
13. Ryabov, A. D.; Le Lagadec, R.; Estevez, H.; Toscano, R. A.; Hernandez, S.; Alexandrova, L.; Kurova, V. S.; Fischer, A.; Sirlin, C.; Pfeffer, M., *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 1626.
14. Boff, B.; Ali, M.; Alexandrova, L.; Espinosa-Jalapa, N. A.; Saavedra-Díaz, R. O.; Le Lagadec, R. *Organometallics*, **2013**, *32*, 5092
15. Bovey, F. A.; Anderson, E. W.; Hood, F. P.; Kornegay, R. L. *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, 144315.
16. Eliel, E. L. *Acc. Chem. Res.* **1970**, *3*, 1.
17. Collins, T. J.; Powell, R. D.; Slebodnick, C.; Uffelman, E. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8419.
18. Polshin, V.; Popescu, D-L.; Fischer, A.; Chanda, A.; Horner, D. C.; Beach, E. S.; Henry, J.; Qian, Y-L.; Horwitz, C. P.; Lente, G.; Fabian, I.; Münck, E.; Bominaar, E. L.; Ryabov, A. D.; Collins, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4497.
19. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.;

- Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09, Revision B.01*, **2009**.
20. Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 3.
21. Becke, A. D. *Phys. Rev. A*, **1998**, *38*, 3098.
22. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B*, **1988**, *37*, 785.
23. Chanda, A.; Chakrabarti, S. M.; Ellis, W. C.; Popescu, D. L.; Tiago de Oliveira, F.; Wang, D.; Que Jr., L.; Collins, T. J.; Münck, E.; Bominaar, E. L. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 3669.
24. Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 6378.
25. Ghosh, A.; Ramidi, P.; Pulla, S.; Sullivan, S. Z.; Collom, S. P.; Gartia, Y.; Munshi, P.; Biris, A. S.; Noll, B.C.; Berry, B. C. *Catal. Lett.* **2010**, *137*, 1.
26. Hathaway, B.; Holm, D. G.; Underhill, A. E. *J. Chem. Soc.* **1962**, 2444.
27. Saavedra-Díaz, R. O.; Le Lagadec, R.; Shen, L. Q.; Ryabov, A. D. *J. Coord. Chem.* **2014**, *67*, 3909.

8. Complejos de rutenio como efectores de la glucosa oxidasa

En este capítulo se presenta la metodología y los resultados obtenidos sobre un estudio cinético que se llevó a cabo para establecer el efecto que tienen los complejos ciclometalados de rutenio sobre la reacción de oxidación de β -D-glucosa con glucosa oxidasa proveniente de *aspergillus niger*. Para tal motivo se eligió una serie de complejos de rutenio con estructuras similares a base de 2-fenilpiridina y bipyridina.

8.1. Síntesis de complejos ciclometalados

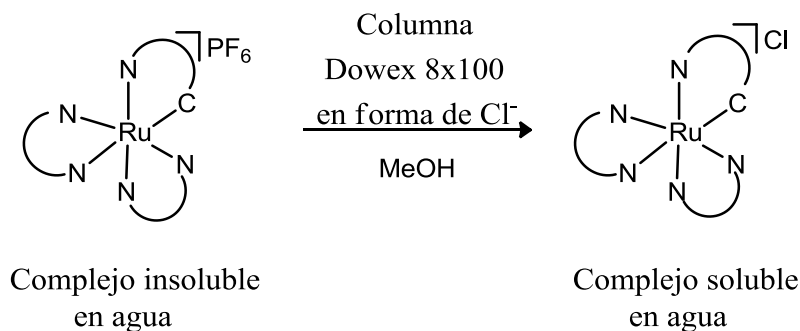


Esquema 8.1. Síntesis de los complejos de rutenio 16-20 utilizados en el estudio cinético.

En el esquema 8.1 se presenta la serie de complejos, así como la ruta sintética seguida para obtener cada uno de ellos, (la síntesis de estos complejos fue informada en trabajos previos)¹⁻⁵ y poder realizar el estudio cinético sobre la reacción de oxidación de glucosa con GO.

En el esquema 8.1 se puede observar que la diferencia primordial entre los complejos **16**, **17** y **20** se centra en el número de enlaces σ -C-Ru, lo que se refleja en sus propiedades electrónicas y potencial redox.

La síntesis de los complejos se llevó a cabo como se informó en la literatura.¹⁻⁵ El complejo **16** corresponde a un compuesto de coordinación de Ru^{II} en el cual no existe ningún enlace C-Ru, es dicationico y su potencial redox es: $E_{\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}} = 1383 \text{ mV}$. Este compuesto es completamente soluble en agua por lo que no se hizo mayor cambio. Los complejos **17** y **18** son especies ciclometalados de Ru^{II} , contienen un enlace σ -C-Ru y son catiónicos, sus potenciales redox son $E_{\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}} = 557 \text{ mV}$ para **17** y $E_{\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}} = 589 \text{ mV}$ para **18**. Se observa una drástica disminución del potencial redox con respecto al compuesto **16**. Para sintetizar estos complejos se emplea el mismo procedimiento cambiando únicamente el ligante utilizado (2,2'-bipiridina para el complejo **17** y 1,10-fenantrolina para el **18**).³ En ambos casos se obtuvieron complejos monocationicos con el anion PF_6^- . En esta forma los complejos son insolubles en agua lo que representó un inconveniente debido a que los ensayos deben realizarse en este medio. Para resolver el problema fue necesario hacer una metátesis donde se intercambió el anion PF_6^- por Cl^- resultando en especies solubles en agua.⁶



Esquema 8.2. Reacción de metátesis para hacer los complejos solubles en agua.⁶

El complejo **19** es un complejo de Ru^{III} , tiene la misma estructura que el complejo **17** pero está oxidado. La síntesis se llevó a cabo oxidando el complejo **17** con H_2O_2 y usando Fe-TAML como catalizador en disolución acuosa saturada de NaCl. Para esta reacción nos basamos en los resultados presentados en la literatura donde presentan la síntesis del complejo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ al oxidar con peróxido y HRP el complejo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$,⁷ y también en la literatura presentan la oxidación de $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{bpy})_2]^+$ con H_2O_2 catalizada por Fe-TAML.^{8,9} Por espectroscopía UV-vis fue posible observar el cambio en el espectro de absorción entre ambas especies:

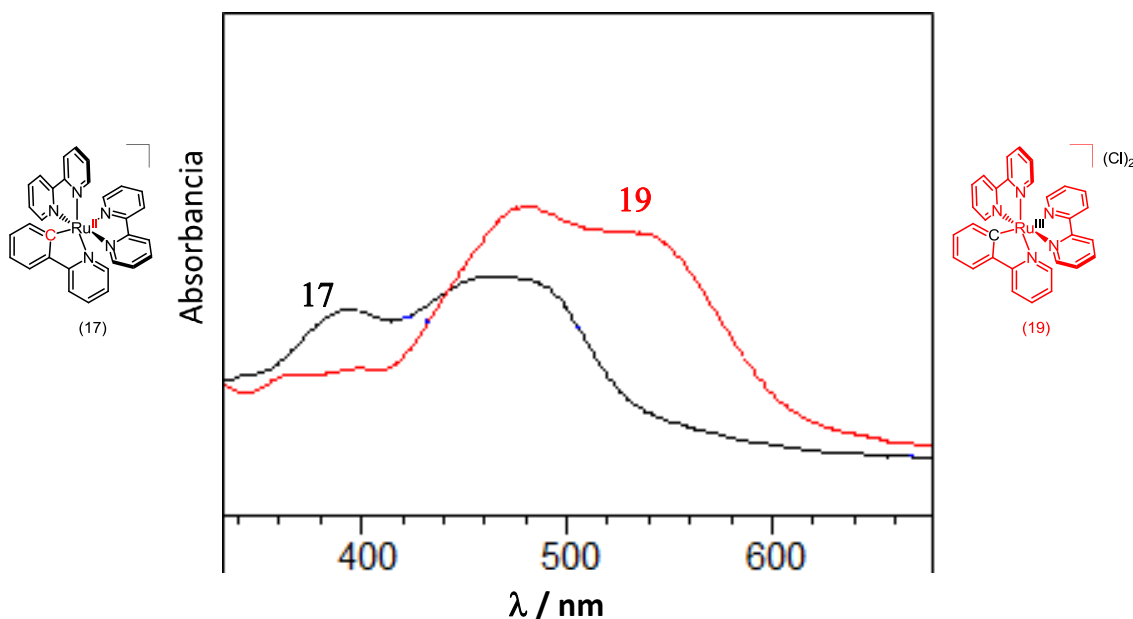


Figura 8.1 Espectros de UV-vis de los complejos 17 y 19

El complejo **20** es catiónico, bis-ciclometalado de Ru^{III} que contiene 2 enlaces $\sigma\text{-C-Ru}$ y tiene un potencial redox $E_{\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}} = -230 \text{ mV}$. Como podemos apreciar, el potencial nuevamente disminuye con respecto al complejo **17**. En este caso al igual que **17** y **18** fue necesario hacer una metátesis para cambiar el anión por Cl^- y hacerlo soluble en agua.⁴

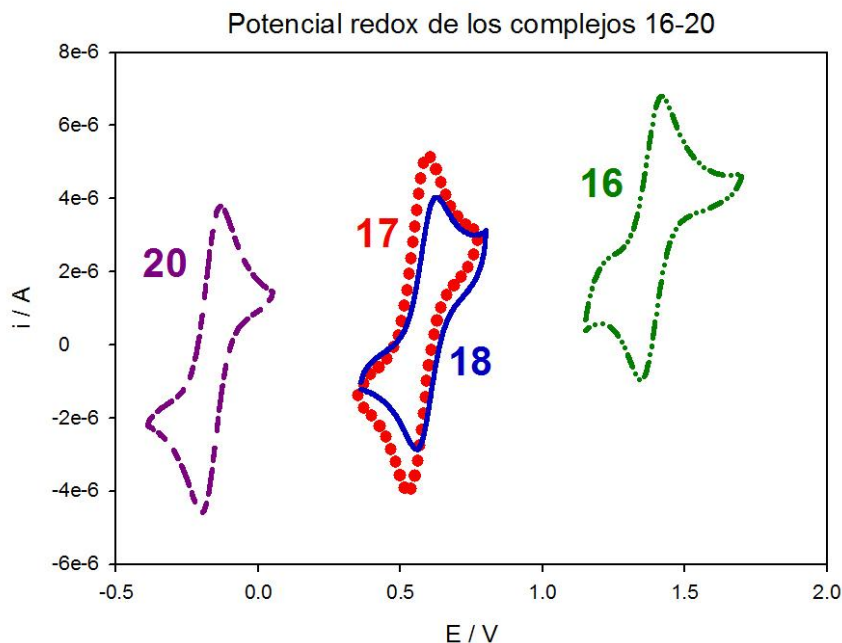
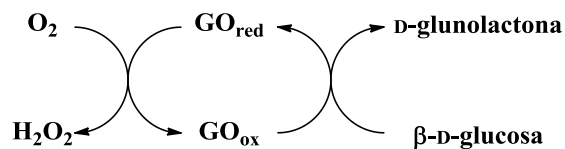
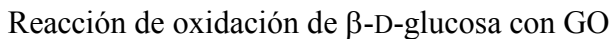
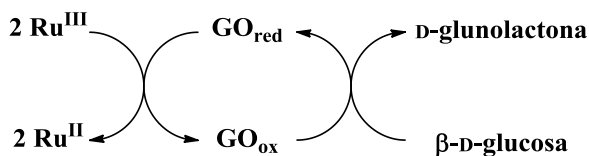


Figura 8.2. Voltamperometría cíclica de los complejos 16-20 obtenida en CH₃CN a una concentración de 1x10⁻³M, utilizando [Bu₄N]PF₆ 0.1M como electrolito soporte, en una celda con un electrodo de trabajo de carbón vítreo, contraelectrodo de Pt y electrodo de referencia de Ag/AgCl

Diversos complejos de rutenio han sido aplicados como mediadores con la glucosa oxidasa, porque existe una interacción entre el sitio activo de la enzima y los complejos que permite la transferencia de electrones. La mayoría de estos estudios se enfocaron principalmente en determinar la constante de velocidad de transferencia de electrones entre la enzima y los complejos y se realizaron en condiciones libres de O_2 . A través de ellos se encontró que los complejos de Ru^{III} podían sustituir al O_2 oxidando a la enzima, la cual después llevaba a cabo la oxidación de la β -D-glucosa.^{10,11}

Reacción de oxidación de β -D-glucosa con GO con complejos de Ru^{III} en ausencia de O_2 

Utilizando voltamperometría cíclica se forma un ciclo catalítico en donde el complejo de Ru^{II} se oxida en la superficie del electrodo pasando a Ru^{III} . Este complejo que se forma continuamente *in situ* oxida el sitio activo de la enzima la cual transforma la glucosa a gluconolactona. Sin embargo, no se ha estudiado el efecto que causan los complejos de rutenio cuando está presente el oxígeno en la reacción.

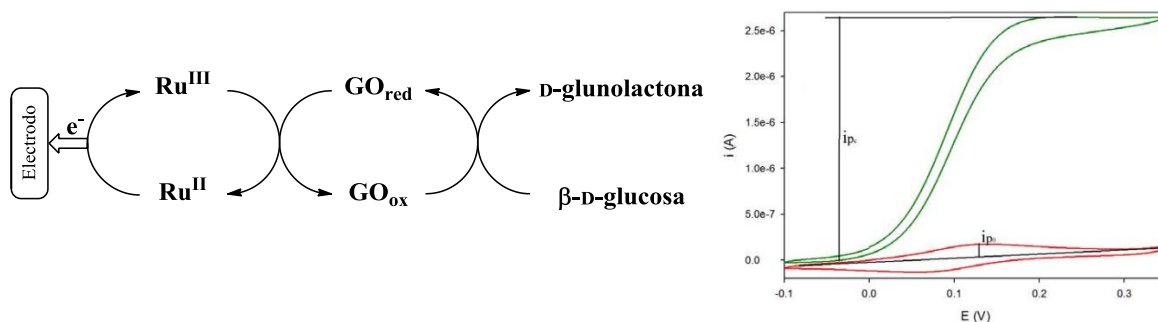


Figura 8.3. Representación del ciclo catalítico (izquierda) en la oxidación de $\beta\text{-D-glucose}$ con GO utilizando el complejo 17 en ausencia de O_2 y voltamperometría cíclica (derecha).

8.2. Metodología del estudio cinético

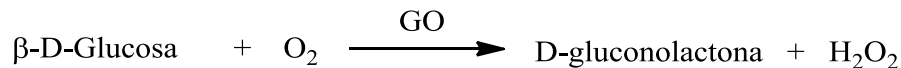
Nuestro estudio consistió en medir la concentración de O_2 durante la reacción de oxidación de glucosa con GO en presencia y ausencia de los diferentes complejos de rutenio.

En la literatura se informa que la glucosa oxidasa es activa en un rango de pH de 3-10 y una temperatura hasta 70 °C, siendo las condiciones óptimas a pH = 5 y una temperatura de 37 °C.¹² En este trabajo se utilizó una temperatura de 25 °C debido a diversas complicaciones que se presentaron en el equipo, la diferencia en la temperatura de trabajo y la óptima no resultó ser un factor crucial en los resultados, pero si es de vital importancia mantener una temperatura constante durante todo el proceso, puesto que la concentración de O_2 disuelto depende de ello.

Para monitorear la concentración de oxígeno en el tiempo se utilizó un sensor de oxígeno disuelto (electrodo de Clark), en una celda de 1.5 ml con agitación y temperatura constantes. Para iniciar las mediciones, la reacción fue activada con la adición de glucosa.

8.2.1. Curva estándar (ausencia de complejos)

La primera serie de ensayos se llevó a cabo en ausencia de complejos de rutenio lo que permitió determinar los parámetros cinéticos K_m y V_{max} para la reacción:



Las condiciones experimentales utilizadas fueron: concentración de GO 1×10^{-8} M a pH = 5 en buffer de fosfatos 0.05 M y 25°C, y concentraciones de glucosa de 0.0025, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05 y 0.1 M (estas condiciones se mantuvieron constantes durante el resto de los experimentos). A partir de los datos recabados se construyó la gráfica de concentración de O_2 en función del tiempo para cada concentración de glucosa

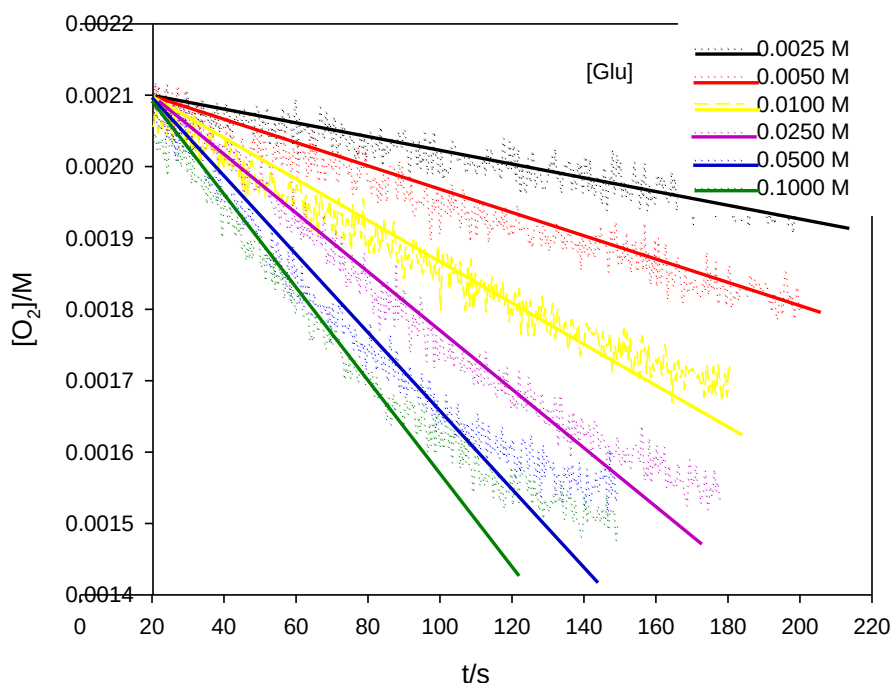


Figura 8.4. Gráfica de concentración de O_2 en función del tiempo a diferentes concentraciones de glucosa. Buffer de fosfatos pH = 5, 0.05 M, 25 °C, $[\text{GO}] = 1 \times 10^{-8}$ M

A partir de los datos graficados anteriormente, se hizo la regresión lineal para cada serie de datos, obteniéndose la ecuación para cada recta cuya pendiente corresponde a la velocidad inicial V_0 . Debemos considerar que para ello se toma únicamente la parte inicial en donde los datos presentan un comportamiento lineal, lo que corresponde a la velocidad inicial. Cabe mencionar que el tiempo que dura este comportamiento depende de la cantidad de sustrato con que se realizó el ensayo.

A partir de los valores obtenidos de V_0 se construyó la gráfica de Michaelis-Menten graficando V_0 en función de la concentración de sustrato.

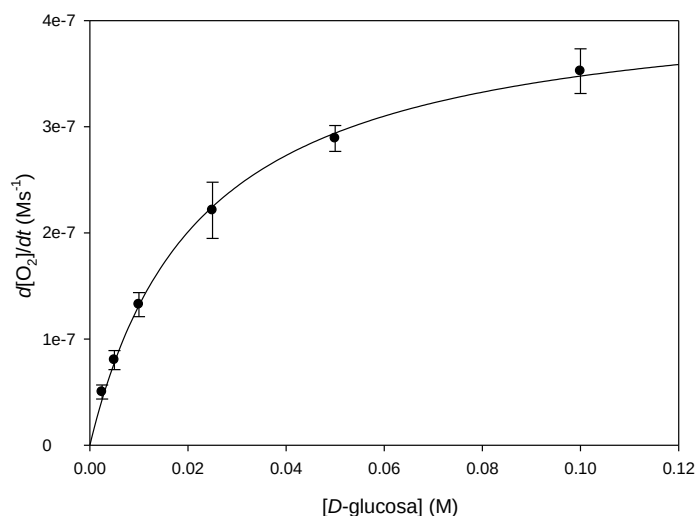


Figura 8.5. Gráfica de Michaelis-Menten para la oxidación de β -D-glucosa mediante glucosa oxidasa en buffer de fosfatos pH = 5, 0.05 M, 25 °C, [GO] = 1×10^{-8} M

En la figura 8.5 podemos observar que la cinética de la reacción tiene un típico comportamiento de las reacciones enzimáticas tipo Michaelis-Menten que corresponde a una ecuación hiperbólica. En la gráfica se observa que el aumento del valor de V_0 (eje de las abscisas) a baja concentración de sustrato es mucho mayor, y conforme la concentración de sustrato aumenta, el incremento de V_0 va disminuyendo hasta tener una concentración donde permanece prácticamente constante.

Una vez obtenida la gráfica de Michaelis-Menten fue posible encontrar por regresión hiperbólica, los parámetros de la ecuación para la curva con la forma $y = ax / (b+x)$ donde $a = V_{max}$ y $b = K_m$, y de esta forma obtener los valores: $K_m = 0.021$ M y $V_{max} = 3.5 \times 10^{-7}$ Ms⁻¹ para la reacción de oxidación de glucosa con GO.¹²

Después se procedió a convertir la gráfica de Michaelis-Menten a la forma de Lineweaver-Burke utilizando el valor de los recíprocos de $1/V_0$ y $1/[\text{sustrato}]$.

La transformación a la gráfica de Lineweaver-Burk se hizo debido a que en ésta resulta más sencillo distinguir el tipo de inhibición reversible en la reacción enzimática del cual se trata. Una segunda ventaja de esta representación radica en que los parámetros K_m y V_{max} se pueden obtener a través de una regresión lineal (y no hiperbólica como la de Michaelis-Menten), donde el valor de la pendiente corresponde a $(K_m / V_{max})(1 / x)$ y la ordenada al origen es $1 / V_{max}$. Es importante mencionar que al llevar a cabo esta segunda transformación los valores obtenidos de V_{max} y V_{max} tienen una mayor incertidumbre.

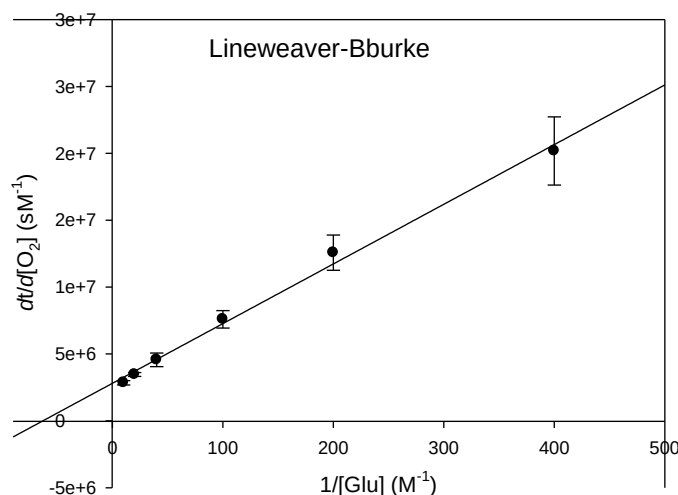


Figura 8.6. Gráfica de Lineweaver-Burke para la oxidación de β -D-glucosa mediante glucosa oxidasa en buffer de fosfatos pH = 5, 0.05 M, 25 °C, $[GO] = 1 \times 10^{-8} M$

8.2.2. Efecto del complejo de coordinación 16

Una vez obtenida la curva patrón en ausencia de complejos de rutenio, se procedió con la serie de ensayos en presencia de los complejos y determinar su efecto sobre la reacción. Para realizar los experimentos con los complejos rutenio, se siguió la misma metodología empleada anteriormente para la curva patrón adicionando la cantidad requerida de una disolución acuosa del complejo correspondiente. Para cada una de las concentraciones de los complejos de rutenio se realizó una curva similar a la curva patrón, es decir, con cada concentración de complejo se realizaron 6 ensayos correspondientes a las 6 diferentes concentraciones de glucosa y este proceso se hizo por duplicado. Los datos obtenidos a partir de los ensayos fueron tratados de misma manera en que se llevó a cabo con los datos de la curva patrón.

En primer lugar se realizaron los ensayos utilizando el complejo de coordinación **16** en las siguientes concentraciones: 0.0025, 0.0037, 0.0050 y 0.0075 M.

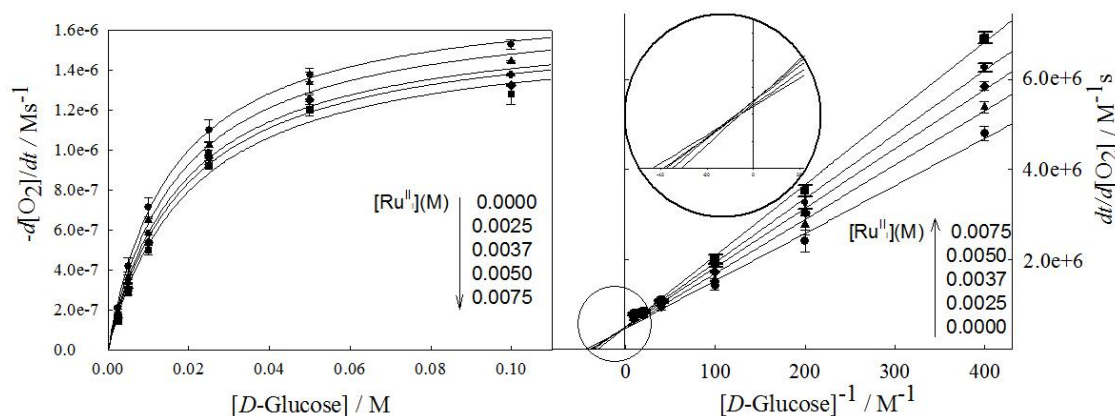


Figura 8.6. Gráfica de Michaelis-Menten (izquierda) y Lineweaver-Burke (derecha) para la oxidación de β -D-glucosa mediante glucosa oxidasa en buffer de fosfatos pH = 5, 0.05 M, 25 °C, $[GO] = 1 \times 10^{-8} M$ en presencia de diferentes concentraciones del complejo 16.

En la gráfica de Michaelis-Menten se observa que la curva estándar ($[Ru] = 0$) se encuentra en la parte superior y a medida que la concentración del complejo de rutenio fue aumentando, la velocidad inicial de consumo de O_2 fue disminuyendo. Este efecto se observa en la gráfica a manera que las curvas van disminuyendo de su altura, siendo la curva inferior aquella que corresponde a la mayor concentración del complejo. Este tipo de comportamiento implica que existe una inhibición reversible. En la gráfica de Lineweaver-Burk se observa la tendencia contraria a la de Michaelis-Menten, es decir, la recta que corresponde al estándar se encuentra en la parte inferior, y a medida que aumenta la concentración de rutenio las rectas se dirigen hacia la parte superior, siendo la última, la que corresponde a la mayor concentración de rutenio. En esta gráfica se observa que las rectas se intersectan en la ordenada al origen, lo que quiere decir que, la V_{max} permanece constante mientras que la K_m aumenta, un comportamiento que corresponde a la inhibición de tipo competitiva (ver sección 2.2.3.).

El complejo de rutenio puede unirse con la enzima libre impidiendo la unión de la glucosa y disminuyendo la velocidad de la reacción, la glucosa no se puede unir a la enzima hasta que se disocie la unión del complejo de rutenio y la enzima.

8.2.3. Efecto de complejos ciclometalados de rutenio

La siguiente serie de experimentos fue realizada con los complejos **17** y **18**, ambos contienen un enlace σ -C-Ru donde el metal se encuentra en estado de oxidación II. Obteniendo los siguientes comportamientos:

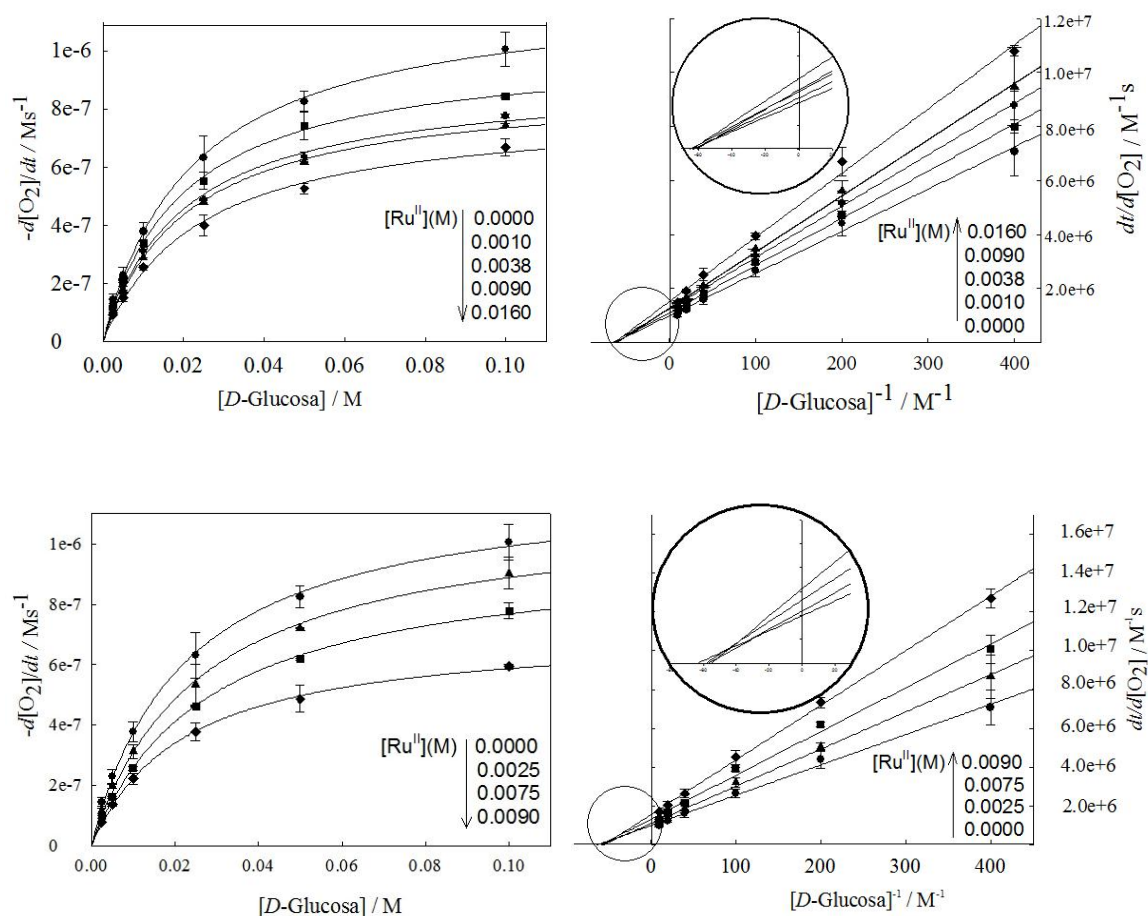


Figura 8.7. Gráfica de Michaelis-Menten (izquierda) y Lineweaver-Burke (derecha) para la oxidación de β -D-glucosa mediante glucosa oxidasa en buffer de fosfatos pH = 5, 0.05 M, 25 °C, [GO] = 1×10^{-8} M en presencia de diferentes concentraciones de los complejos **17** (superior) y **18** (inferior).

Similar al caso anterior, en la gráfica de Michaelis-Menten para los complejos **17** y **18** se observa que la curva en la parte superior corresponde al estándar y que al aumentar la concentración de los complejos de rutenio, la velocidad de consumo de O_2 va disminuyendo, es decir, también se observa una inhibición reversible. Examinando detenidamente las gráficas, se puede notar que la forma de las curvas es distinta a la obtenida para el complejo **16**. Esta diferencia es mucho más evidente al observar las

gráficas de Lineweaver-Burke en donde para los complejos **17** y **18** las rectas se intersectan en la abscisa al origen, lo que implica que el valor de K_m es constante mientras el de V_{max} va disminuyendo. Esto corresponde a una inhibición de tipo no competitiva, diferente comportamiento a la inhibición competitiva encontrada para el complejo **16** (ver sección 2.2.3.).

En este caso los complejos de rutenio interaccionan con la enzima en un lugar más lejano al sitio activo, a diferencia del caso anterior, permite la unión del sustrato a la enzima, pero no se puede llevar a cabo la reacción catalítica mientras el complejo de rutenio este unido a la enzima.

Para cada concentración de los complejos (**16**, **17** y **18**) utilizada se obtuvo un valor de K_m y V_{max} , los cuales se denotan como $K_{m,eff}$ y $V_{m,eff}$, a través de estos parámetros fue posible obtener el valor de la constante de inhibición (K_i) para cada uno de los complejos de rutenio II.

Para la inhibición competitiva (complejo **16**), la ecuación de Michaelis–Menten en función de la concentración de inhibidor se puede escribir como (ver sección 2.2.3):

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_m + [S]} = \frac{V_{max}[S]}{K_{m,eff} + [S]} \quad (1) \quad \text{Donde:} \quad \alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i} \quad (2)$$

Con las ecuaciones 1 y 2, podemos definir la ecuación 3:

$$K_{m,eff} = K_m + \frac{K_m}{K_i}[I] \quad (3)$$

A partir de la ecuación 3 se puede graficar $K_{m,eff}$ en función de la concentración de $[I]$, obteniendo una recta cuya pendiente corresponde al valor de K_m/K_i , y el valor de la ordenada al origen es K_m . La ecuación 3 solo puede ser usada para la inhibición competitiva.

Para la inhibición no competitiva (complejos **17** y **18**) la ecuación de Michaelis-Menten en función de la concentración de inhibidor se escribe como:

$$V_0 = \frac{(V_{max}/\alpha')[S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{m,eff}[S]}{K_m + [S]} \quad (4) \quad \text{Donde:} \quad \alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_i} \quad (5)$$

Tomando 4 y 5 podemos definir la ecuación 6:

$$\frac{1}{V_{m,eff}} = \frac{1}{V_m} + \frac{1}{V_m K_i} [I] \quad (6)$$

A partir de la ecuación 6 se puede graficar el inverso de $V_{m,eff}$ en función de $[I]$, obteniendouna recta cuya pendiente corresponde al valor de $1/(K_i V_m)$ y la ordenada al origen es el inverso de V_m . Esta ecuación únicamente es útil para la inhibición no competitiva.

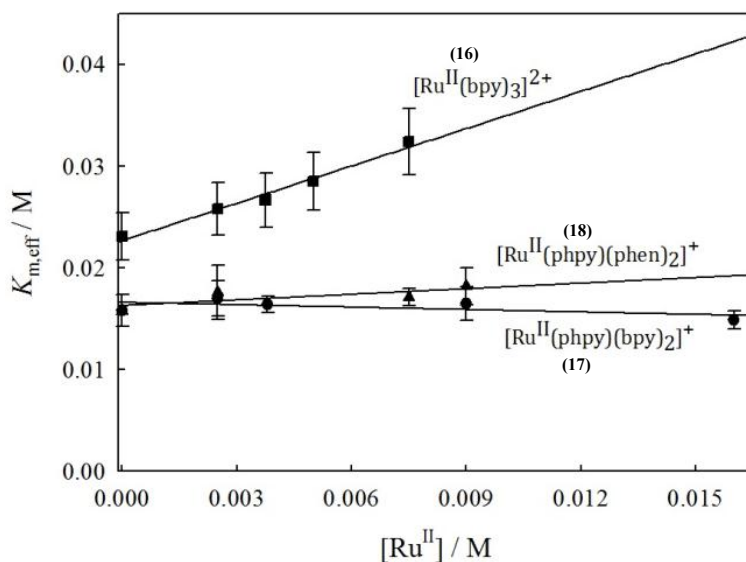


Figura 8.8. Gráfica de $K_{M,eff}$ en función de $[Ru^{II}]$, para obtener la K_i del complejo 16.

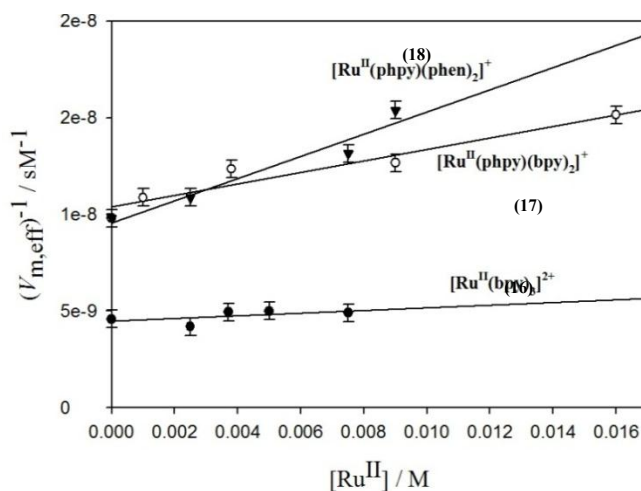


Figura 8.9. Gráfica $1/V_{m,eff}$ en función de $[Ru^{II}]$ para obtener K_i de los complejos 17 y 18.

A partir de las gráficas de la figura 8.8 y mediante la ecuaciones 3 y 6 se obtuvieron los valores de K_i para cada uno de los complejos de rutenio (II). Mismos que se muestran en la siguiente tabla junto con los valores de $K_{m,eff}$ y $V_{m,eff}$.

Complejo	Conc. (M)	$10^7 \times V_{m,eff} (Ms^{-1})$	$10^2 \times K_{m,eff} (M)$	$K_i (M)$
16	0	21.8 ± 0.3	2.31 ± 0.03	0.018 ± 0.006
	0.0025	31.3 ± 0.1	2.58 ± 0.01	
	0.0037	20.2 ± 0.2	2.67 ± 0.03	
	0.0050	20.0 ± 0.3	2.85 ± 0.04	
	0.0075	20.4 ± 0.2	3.24 ± 0.03	
17	0	10.2 ± 0.1	1.58 ± 0.04	0.036 ± 0.005
	0.0010	9.2 ± 0.1	1.59 ± 0.02	
	0.0038	8.1 ± 0.1	1.54 ± 0.01	
	0.0090	7.9 ± 0.1	1.64 ± 0.04	
	0.0160	6.6 ± 0.1	1.58 ± 0.02	
18	0	10.2 ± 0.1	1.58 ± 0.04	0.017 ± 0.002
	0.0025	9.2 ± 0.2	1.76 ± 0.06	
	0.0075	7.6 ± 0.1	1.71 ± 0.04	
	0.0090	6.5 ± 0.3	1.82 ± 0.09	

Tabla 8.1. valores de $V_{m,eff}$, $K_{m,eff}$ y K_i obtenidos para los complejos 16, 17 y 18 en la reacción de oxidación de glucosa con glucosa oxidasa.

En la tabla 8.1 observamos que los valores de K_i tienen el mismo orden entre si y también son del mismo orden de los valores de K_m lo que implica que los complejos de rutenio no son “fuertes” inhibidores de la reacción.

8.2.4. Efecto de complejos de Ru^{III}

Finalmente, se llevaron a cabo los correspondientes ensayos utilizando complejos de Ru^{III} . Al realizar los ensayos con el complejo 19 (que contiene un enlace σ -C-Ru y se encuentra como Ru^{III}) y obtener la gráfica de concentración de O_2 en función del tiempo se observó un comportamiento distinto al de los complejos de Ru^{II} .

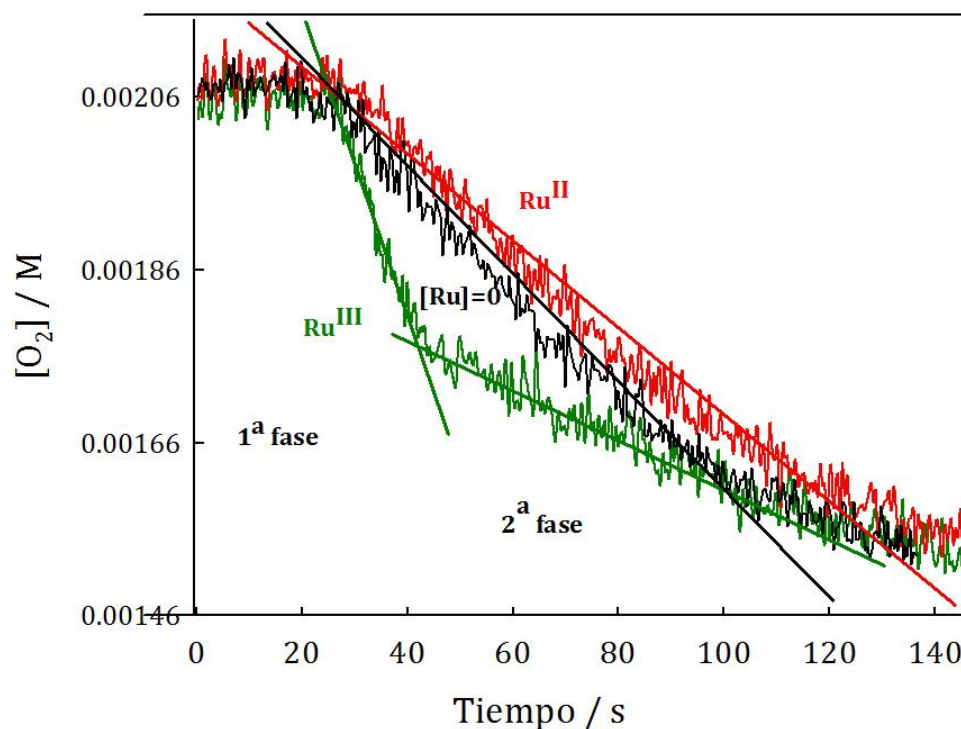


Figura 8.10. Gráfica de concentración de O_2 en función de tiempo obtenido en ausencia de complejo de Ru (negro), en presencia del complejo 17 de Ru^{II} (rojo) y 19 de Ru^{III} (azul)

En la gráfica se muestran las curvas que corresponden a los ensayos realizados en ausencia de complejos y en presencia de Ru^{II} y de Ru^{III} . Podemos observar que la curva correspondiente a Ru^{II} (color rojo) se encuentra por encima de la curva patrón realizada en ausencia de complejo (color negro), es decir, que la disminución de O_2 es más lenta, lo que implica inhibición de la reacción enzimática. Mientras la curva correspondiente al ensayo realizado en presencia de complejo de Ru^{III} (color verde) se encuentra por debajo de la curva patrón, es decir, la disminución de O_2 es más rápida, lo que significa que existe una activación de la enzima, o que acelera la reacción.

Además en la curva con Ru^{III} se observan 2 fases, en primer lugar una rápida disminución de la concentración de O_2 mayor que en ausencia de complejo, en esta fase ocurre principalmente la activación. Este comportamiento está de acuerdo con los estudios realizados anteriormente ya que para las especies de Ru^{III} se obtuvieron constantes de velocidad de intercambio de electrones con la enzima mayores a la del oxígeno.¹⁶

En la segunda fase se obtiene un comportamiento similar a lo observado con los complejos **16**, **17** y **18**, es decir, la disminución en la concentración de O_2 es más lenta que en ausencia de complejo porque existe una inhibición.

La aparición de las 2 fases se explica debido a que en primer lugar el complejo de Ru^{III} acelera la reacción al promover la oxidación del sitio activo de la enzima. Una vez que esto ocurre, el complejo se reduce a Ru^{II} el cual actúa ahora como inhibidor de la reacción. La activación se presenta solamente cuando existe el complejo de Ru^{III} , cuando todo el complejo se ha reducido, se pierde el efecto de activación de la enzima y solo se observa la inhibición por parte del complejo de Ru^{II} que se ha formado. Los datos graficados representan el conjunto de ambos efectos puesto que ambos fenómenos ocurren de manera simultánea. La división de las fases se debe al cambio en la concentración de las especies presentes, así conforme la concentración de complejo de Ru^{III} disminuye, la concentración de Ru^{II} en la reacción aumenta.

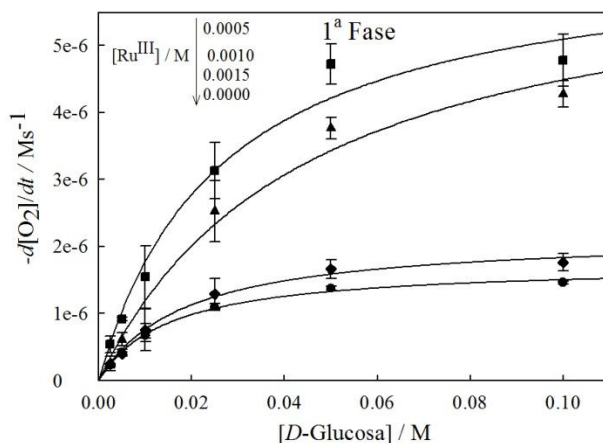


Figura 8.11. Gráfica de Michaelis-Menten obtenida para la primera fase de la oxidación de glucosa con glucosa oxidasa en presencia del complejo **19**.

Durante la primera fase se observa con mayor intensidad el efecto de activación debido al complejo de Ru^{III} . En la gráfica de Michaelis-Menten la curva que se encuentra por debajo de las otras corresponde al estándar (ensayo en ausencia de complejo), y cuando está presente el complejo la velocidad inicial del consumo de O_2 es mayor, lo opuesto a lo observado para los complejos de Ru^{II} . En la gráfica también se observa que la curva que está por encima de todas corresponde al ensayo con la menor cantidad de complejo de Ru^{III} ,

es decir, la disminución de la concentración de O_2 es mayor cuando la concentración de Ru^{III} es menor y conforme ésta aumenta la velocidad en el consumo de O_2 disminuye. Este comportamiento fue completamente inesperado, se han encontrado fenómenos similares en disruptores endocrinos y se le conoce como efecto no monotónico, lo que significa que no existe una relación directa entre la concentración del efector y el efecto observado, obteniendo comportamientos muy variados. Este fenómeno ha dado lugar a una gran discusión en la comunidad científica pero aún no se ha determinado su causa.¹⁴⁻¹⁶

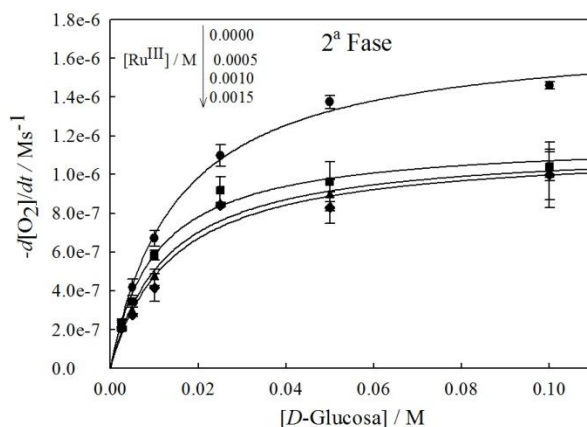


Figura 8.12. Gráfica de Michaelis-Menten para la segunda fase de la reacción de oxidación de glucosa con glucosa oxidasa en presencia del complejo 19.

En la gráfica de Michaelis-Menten para la segunda fase se observa predominantemente el efecto de la inhibición debida al complejo de Ru^{II} . Esta debe corresponder a una inhibición tipo no competitiva puesto que se forma el complejo 17. Sin embargo, no se tienen datos para esta tendencia desde el tiempo cero. Además siempre existe un pequeño efecto debido a la activación del complejo de Ru^{III} , por lo que es incorrecto hacer el mismo análisis realizado para el complejo 17.

Al observar los resultados obtenidos para el complejo 19, decidimos utilizar otro complejo de Ru^{III} y compararlos. Con este propósito se utilizó el complejo 20 de Ru^{III} que contiene 2 enlaces σ -C-Ru y cuyo potencial redox es mucho más bajo que el complejo 19.

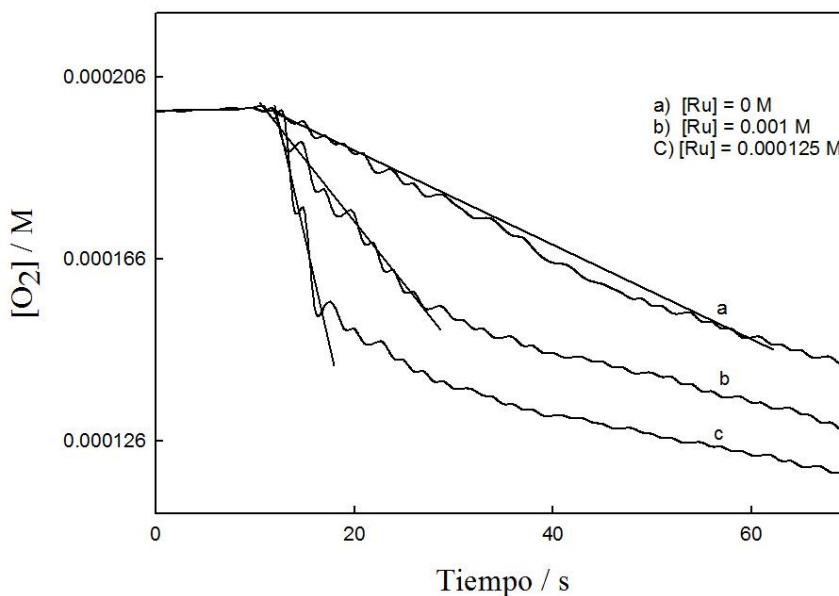


Figura 8.12. Gráfica de concentración de O_2 en función de tiempo para la oxidación de glucosa con glucosa oxidasa en ausencia de complejo 20 (a) y en presencia de este (b y c).

En la gráfica de concentración de O_2 en función del tiempo encontramos el mismo comportamiento observado anteriormente en el complejo **19**. Nuevamente, se observan 2 fases, en donde la primera corresponde a una activación de la enzima y la segunda fase a una inhibición. Aunado a esto, también fue posible observar el efecto no monotónico donde la menor concentración de complejo (c) obtuvo el mayor efecto de activación.

A partir de estos resultados se encontraron 3 formas diferentes en las cuales los complejos de rutenio pueden afectar la oxidación de la glucosa con glucosa oxidasa. De manera general los complejos de Ru^{II} actúan como inhibidores reversibles disminuyendo la velocidad de la reacción. El complejo de coordinación actúa como inhibidor competitivo mientras que los complejos ciclometalados son inhibidores no competitivos. Por su parte, los complejos de Ru^{III} aceleran la reacción ya que pueden interactuar con la enzima y promover su oxidación haciendo la reacción más rápida.

8.3. Parte experimental

Las determinaciones electroquímicas se realizaron en un galvanostato potenciostato AUTOLAB modelo PGSTAT 12 en una celda de 3 electrodos: electrodo auxiliar de

platino, electrodo de referencia de Ag/AgCl y electrodo de trabajo de carbón vítreo. El electrodo de trabajo fue cuidadosamente pulido con 3 disoluciones de diamante de 15, 3 y 1 μm y antes de realizar cada medición con alumina de 0.05 μm y fue lavado con acetona y agua HPLC. El electrolito soporte usado fue hexafluorofosfato de tetrabutilamonio 0.1 M en acetonitrilo, los experimentos se realizaron bajo atmósfera de N_2 .

El monitoreo de la concentración de oxígeno se llevó a cabo en un electrodo de Clark usando una membrana de teflón YSI y equipado con un electrodo YSI 5331 en una celda de 1.5 ml a una temperatura controlada de 25 °C. El electrodo se calibró midiendo el voltaje obtenido con agua destilada a 25 °C y luego tomando la lectura de agua desoxigenada (previamente eliminando el O_2 con vacío y luego burbujeadado con argón). La diferencia de voltaje entre las 2 mediciones fue de 0.16 V el cual fue referido a 1.21×10^{-3} M de O_2 (concentración de O_2 disuelta en agua a 25 °C). Para obtener la concentración molar de oxígeno en las mediciones se utilizó la siguiente ecuación.

$$[\text{O}_2](\text{M}) = (E_f - E_0) \frac{0.00121\text{M}}{0.16\text{V}}$$

En donde E_0 = potencial en ausencia de oxígeno

E_f = potencial observado al tiempo de la medición

Se determinó la concentración real de glucosa oxidasa activa por espectroscopía UV-Vis según el método descrito por Massey,¹⁷ se preparó una disolución de GO 1×10^{-7} M y se tomó lectura a 450 nm en una celda de cuarzo. Después se agregaron unas gotas de una disolución 2 M de β -D-glucosa, se agitó y se volvió a tomar lectura a 430 nm, utilizando la ley de Lambert Beer se obtuvo la concentración de GO real como la resta de ambas mediciones utilizando un valor de $\epsilon = 1.31 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Se prepararon disoluciones stock de glucosa oxidasa 1.5×10^{-7} M, β -D-glucosa 1×10^{-2} M (24 horas antes del ensayo para llegar al equilibrio anomérico), buffer de pH = 5 de fosfatos 1×10^{-3} M y de cada uno de los complejos de rutenio (la concentración stock fue diferente en cada complejo debido a la solubilidad de los mismos). Antes de iniciar el monitoreo de la concentración de O_2 se llenó la celda con las cantidades requeridas de las disoluciones

stock para cada ensayo (excepto glucosa), y se inició el monitoreo de la concentración de oxígeno 20 segundos antes de la adición de glucosa.

8.4. Referencias

1. McFarland, S. A.; Lee, F. S.; Cheng, K. A. W. Y.; Cozens, F. L.; Schepp, N. P. *Can. J. Chem.* **2008**, *86*, 1118.
2. Ryabov, A. D.; Le Lagadec, R.; Estevez, H.; Toscano, R. A.; Hernandez, S.; Alexandrova, L.; Kurova, V. S.; Fischer, A.; Sirlin, C.; Pfeffer, M. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 5.
3. Ryabov, A. D.; Sukharev, V. S.; Alexandrova, L.; Le Lagadec, R.; Pfeffer, M. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6529.
4. Fernandez, S.; Pfeffer, M.; Ritleng, V.; Sirlin, C. *Organometallics*, **1999**, *18*, 2390.
5. Le Lagadec, R.; Alexandrova, L.; Estevez, H.; Pfeffer, M.; Laurinavičius, V.; Razumiene, J.; Ryabov, A. D. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 2735.
6. Gonzalez-Díaz, M. O.; Lopez-Morales, S.; Le Lagadec, R.; Alexandrova, L. *J. Polym. Sci. A: Polym Chem.* **2011**, *49*, 4562.
7. Ryabov, A. D.; Firsova, Y. N.; Ershov, A. Y.; Dementiev, I. A. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 175.
8. Ghosh, A.; Mitchell, D. A.; Chanda, A.; Ryabov, A. D.; Popescu, D. L.; Upham, E. C.; Collins, G. J.; Collins, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15119.
9. Ryabov, A. D.; Cerón-Camacho, R.; Saavedra-Díaz, O.; Denardo, M. A.; Ghosh, A.; Le Lagadec, R.; Collins, T. J. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 9096.
10. Ryabov, A. D.; Sukharev, V. S.; Alexandrova, L.; Le Lagadec, R.; Pfeffer, M. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6529.
11. Soukharev, V. S.; Ryabov, A. D.; Csöregi, E. *J. Organomet. Chem.* **2003**, *668*, 75.
12. Sahmetlioglu, E.; Yürük, H.; Toppare, L.; Cianga, I.; Yagci, Y. *React. Funct. Polym.* **2006**, *66*, 365.
13. Saavedra-Díaz, R. O.; Le Lagadec, R.; Ryabov, A. D. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2013**, *18*, 547.
14. Kohn, M. C.; Melnick, R.L. *J. Mol. Endocrinol.* **2002**, *29*, 113.

15. Vannderberg, L. N.; Colborn, T.; Hayes, T. B.; Heindel, J. J.; Jacobs, D. R.; Lee, D-H.; Shioda, T.; Soto, A. M.; Vom, S. F. S.; Welshoms, W. V.; Zoeller, R. T.; Myers, J. P. *Endocr. Rev.* **2012**, *33*, 387.
16. Zhu, X-W.; Liu, S. S.; Qin, L. T.; Liu, H. L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2013**, *89*, 130
17. Swoboda, B. E. P.; Massey, V. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 2209.

9. Conclusiones.

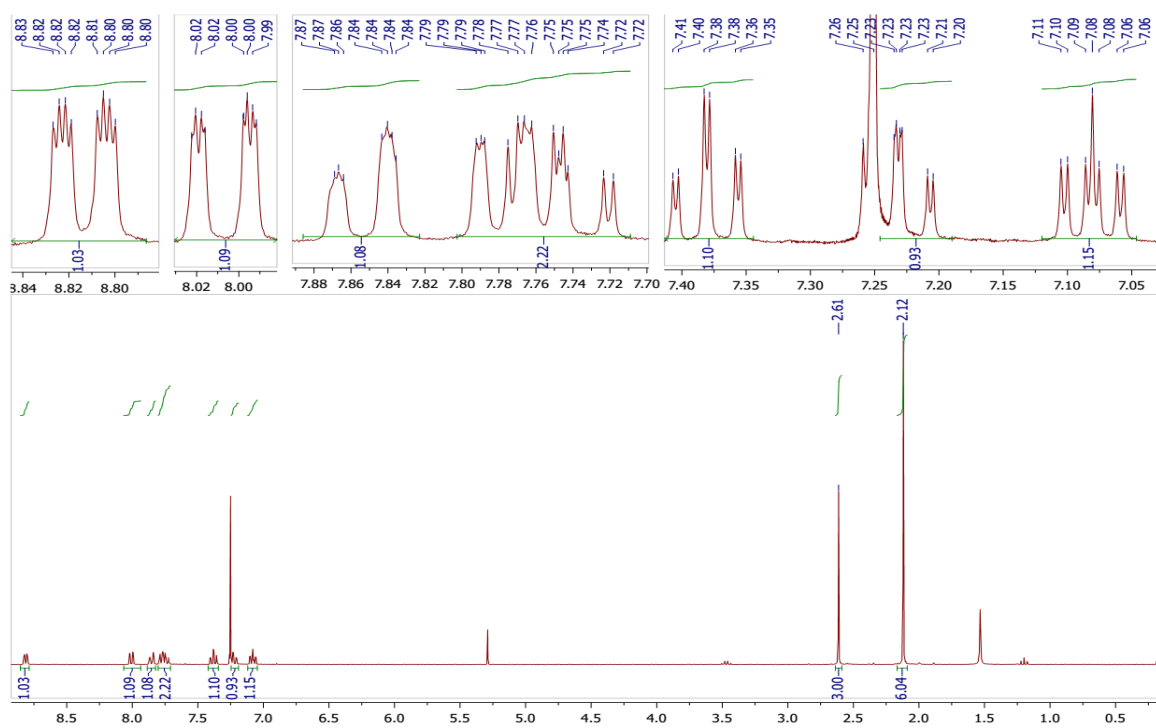
- Las propuestas de modificación sobre la estructura del TAML original, fueron relativamente sencillas. Sin embargo, la introducción de grupos polipiridínicos, trajo consigo un gran número de variables; entre las más importantes encontramos la baja solubilidad en disolventes no polares tanto de las polipiridinas como sus derivados, lo que complicó drásticamente las condiciones experimentales. Un segundo inconveniente radicó en los efectos de inducción por parte de los nitrógenos piridínicos, que modificaron en un nivel mayor al esperado, las propiedades electrónicas de grupos funcionales en otros segmentos de la molécula, y contribuyó a la inestabilidad de los productos.
- El nuevo ligante tetraamidomacrocíclico bpyTAML sintetizado, fue diseñado con un fragmento de bipyridina en la parte externa de su estructura, para tener el potencial de enlazar 2 metales. Conteniendo una cavidad interior que consta de un ciclo de 16 miembros con 4 grupos amida, que al ser desprotonados los nitrógenos *N*-amido pueden enlazar al primer metal, mientras el segundo metal se coordinaría en la parte externa por los 2 nitrógenos *N*-piridínicos.
- Los cálculos DFT muestran que la conformación más estable del ligante bpyTAML no es un ciclo simétrico. Sin embargo, los espectros de RMN son sencillos y lo muestran como si lo fuera, por lo que se piensa que en disolución, el ligante se encuentra en un equilibrio dinámico entre sus distintas conformaciones, similar a lo que ocurre con el ciclohexano.
- La metalación del bpyTAML produce un complejo donde el ligante forma un “plano” alrededor del metal con 4 ciclos, 3 de ellos de 5 miembros y el otro de 9 miembros. El ciclo de 9 miembros provoca que la estructura de los complejos sea poco estable, por lo que la demetalación del complejo y la hidrólisis del ligante se producen en disolución. Bajo estas circunstancias únicamente fue posible caracterizar los complejos con Ni y Co.
- En el complejo $\text{Li}[\text{Co-bpyTAML}]$ el metal se oxidó a Co^{III} , y la evidencia experimental respaldada con cálculos DFT indican que tiene una geometría octaédrica con 2 moléculas de agua en las posiciones axiales. Mientras que en el complejo $\text{Li}_2[\text{Ni-bpyTAML}]$ el metal no se oxidó quedando como Ni^{II} . Se cree que el efecto inductivo de los anillos piridínicos reduce la carga electrónica sobre el metal, por lo que no se promovió la oxidación como en el caso de otros complejos Ni-TAML informados.

- Los cálculos DFT demostraron que en la estructura de los complejos metalados los anillos de piridina se encuentra formando un ángulo de aproximadamente 80° por lo que los *N*-piridínicos no están en la posición adecuada para coordinar un metal como quelato bidentado. Debido a esta característica estructural, fue imposible coordinar el complejo de rutenio al bpyTAML para formar la especie bimetalica deseada.
- A partir de la hidrólisis de los complejos M-bpyTAML fue posible obtener 3 nuevos complejos con Cu, Co y Ni, los cuales posteriormente se sintetizaron directamente por una ruta alterna. En los complejos de Cu y Ni el metal se encuentra en estado de oxidación +2 y tienen una geometría plana de cuadrado, mientras que en el complejo de Co el metal se oxidó a Co^{III} adoptando una geometría octaédrica con un grupo hidroxilo y un agua en las posiciones axiales.
- Por otra parte, en lo que se refiere al estudio cinético realizado sobre la reacción de oxidación de glucosa con glucosa oxidasa, los complejos de rutenio exhibieron distintos efectos dependiendo principalmente del estado de oxidación del metal.
- De manera general los complejos de Ru^{II} inhiben la reacción enzimática de forma reversible y se obtuvieron valores de $k_i \approx K_M$ por lo que no se consideran fuertes inhibidores de la reacción. El complejo de coordinación $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ actúa con un mecanismo de inhibición competitiva, es decir, únicamente se une a la enzima bloqueando la unión del sustrato. Se considera que el sitio de unión es cerca al sitio activo de la enzima. Los complejos mono ciclometalados de Ru^{II} $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{bpy})_2]\text{Cl}$ y $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{phen})_2]\text{Cl}$, actuaron con un mecanismo de inhibición no competitiva, lo que implica que se pueden unir tanto a la enzima como al complejo enzima-sustrato impidiendo la catálisis, se considera que su sitio de unión es más alejado del sitio activo.
- Por su parte en los complejos de Ru^{III} $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{bpy})_2]\text{Cl}_2$ y $[\text{Ru}(\text{phpy})_2(\text{bpy})]\text{Cl}$, se encontraron 2 comportamientos, el primero actuando como activadores de la reacción acelerando el consumo de O_2 , y el segundo como inhibidores (cuando terminó la fase de activación). Este comportamiento permite explicar porque los complejos de Ru^{III} pueden oxidar el sitio activo de la enzima por una reacción redox (como ocurre con el O_2), durante el cual el complejo se reduce a Ru^{II} y empieza a actuar como inhibidor. Sin embargo, en la fase de activación se encontró un comportamiento no monotónico, es decir, que el efecto de activación no es proporcional a la concentración del complejo. De hecho, el mayor efecto se obtuvo cuando se usó la concentración de complejo más baja. El sitio de acción de estos complejos también es alejado del sitio activo.

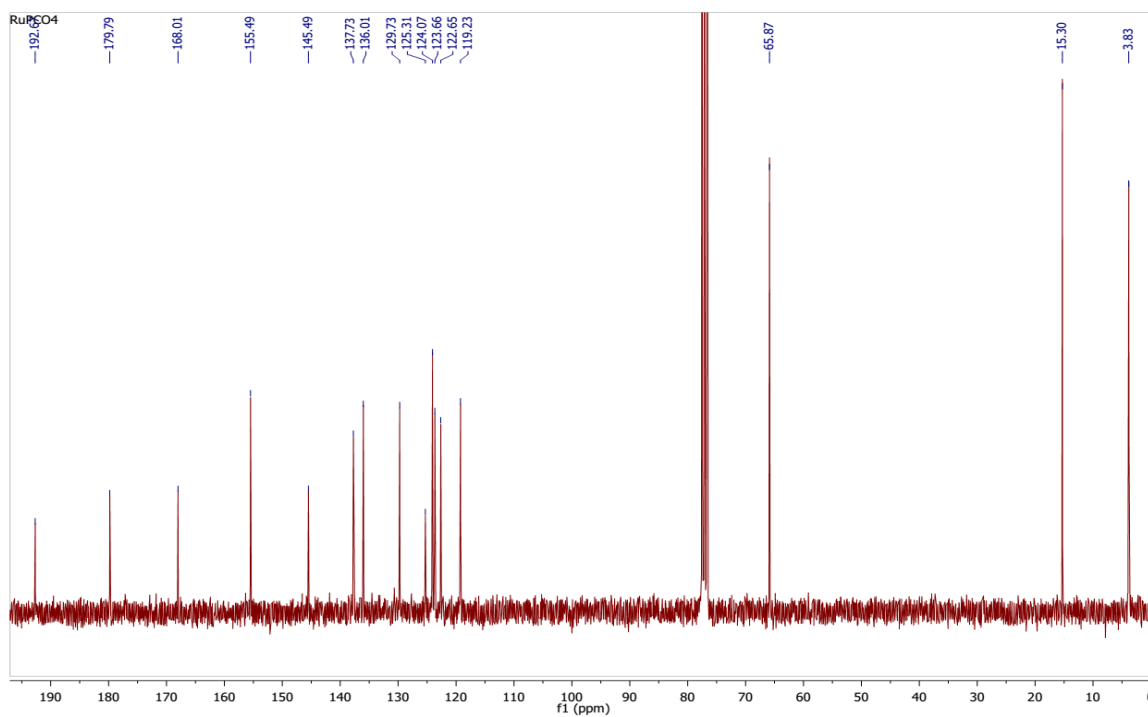
- Los estudios cinéticos realizados, forman parte de la base para buscar los mecanismos de acción, a través de los cuales los complejos de rutenio pueden combatir el cancer.

10. Anexos

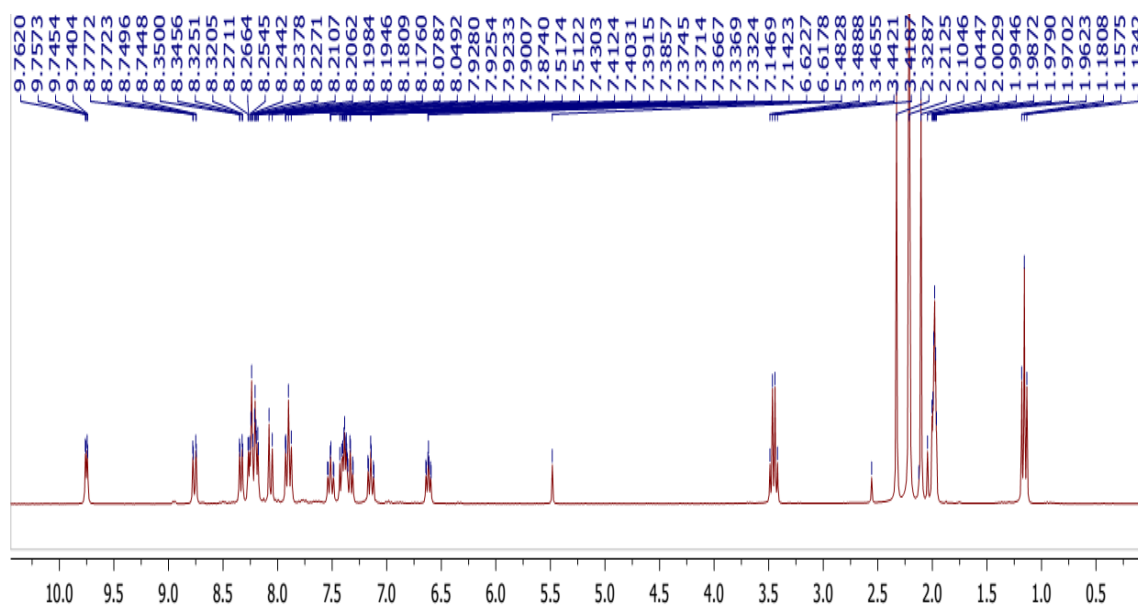
[Ru(phpy)(CO)(CH₃CN)₃][PF₆] (3). RMN ¹H en CDCl₃



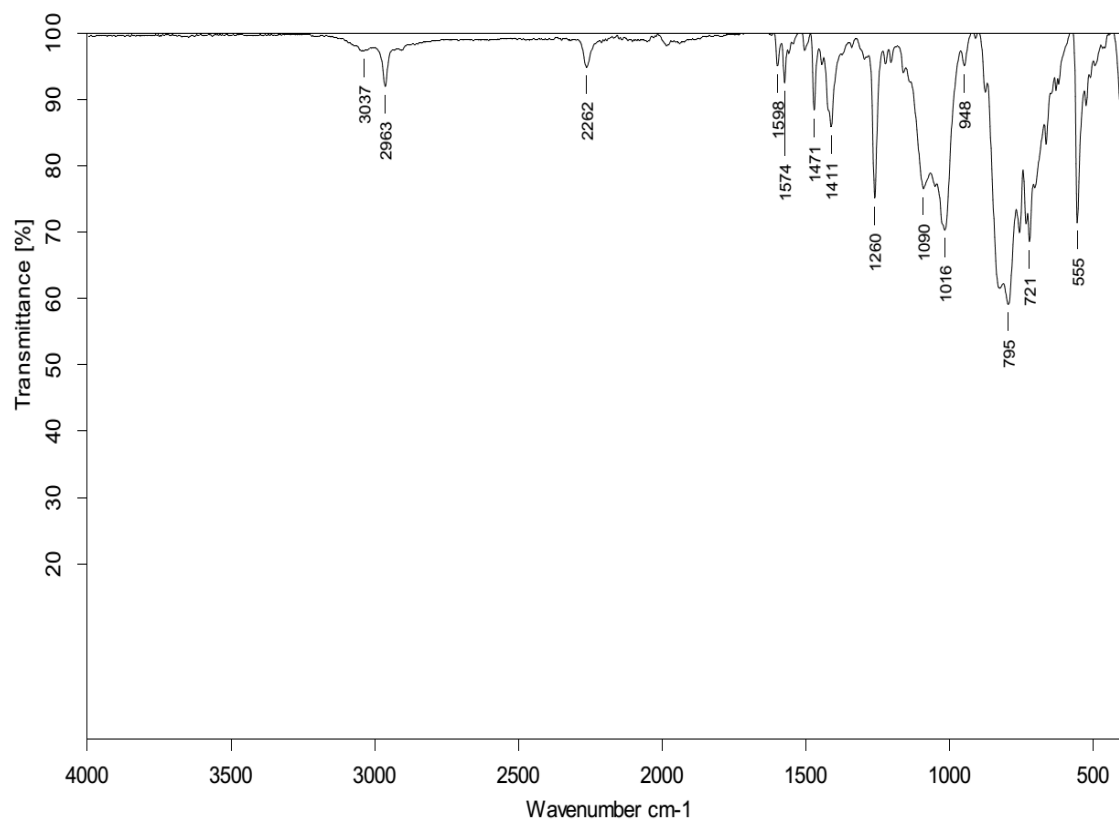
[Ru(phpy)(CO)(CH₃CN)₃][PF₆] (3). RMN ¹³C en CDCl₃



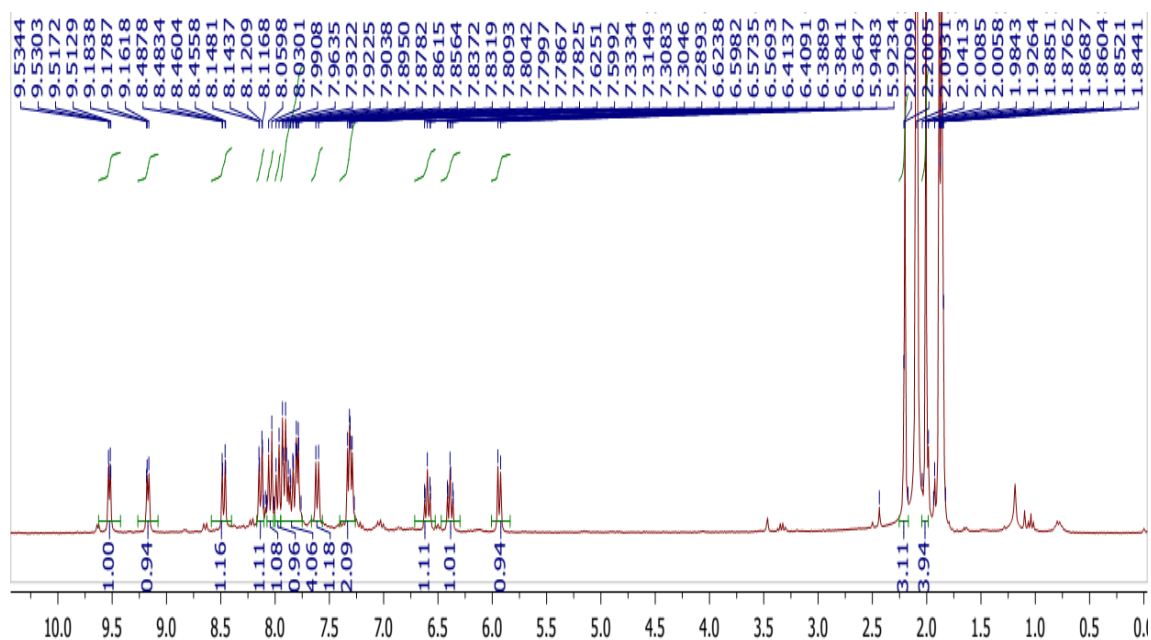
cis-[Ru(phpy)(phen)(CH₃CN)₂]PF₆ (4). RMN ¹H en CD₃CN



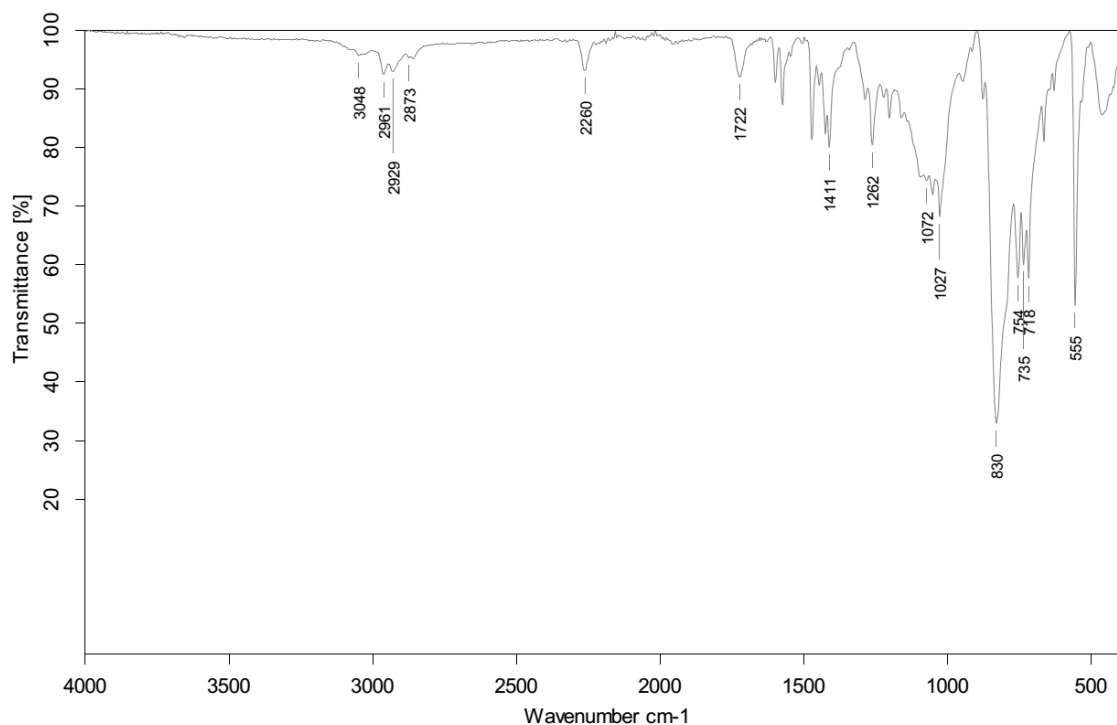
cis-[Ru(phpy)(phen)(CH₃CN)₂]PF₆ (4). Espectro de infrarrojo en sólido



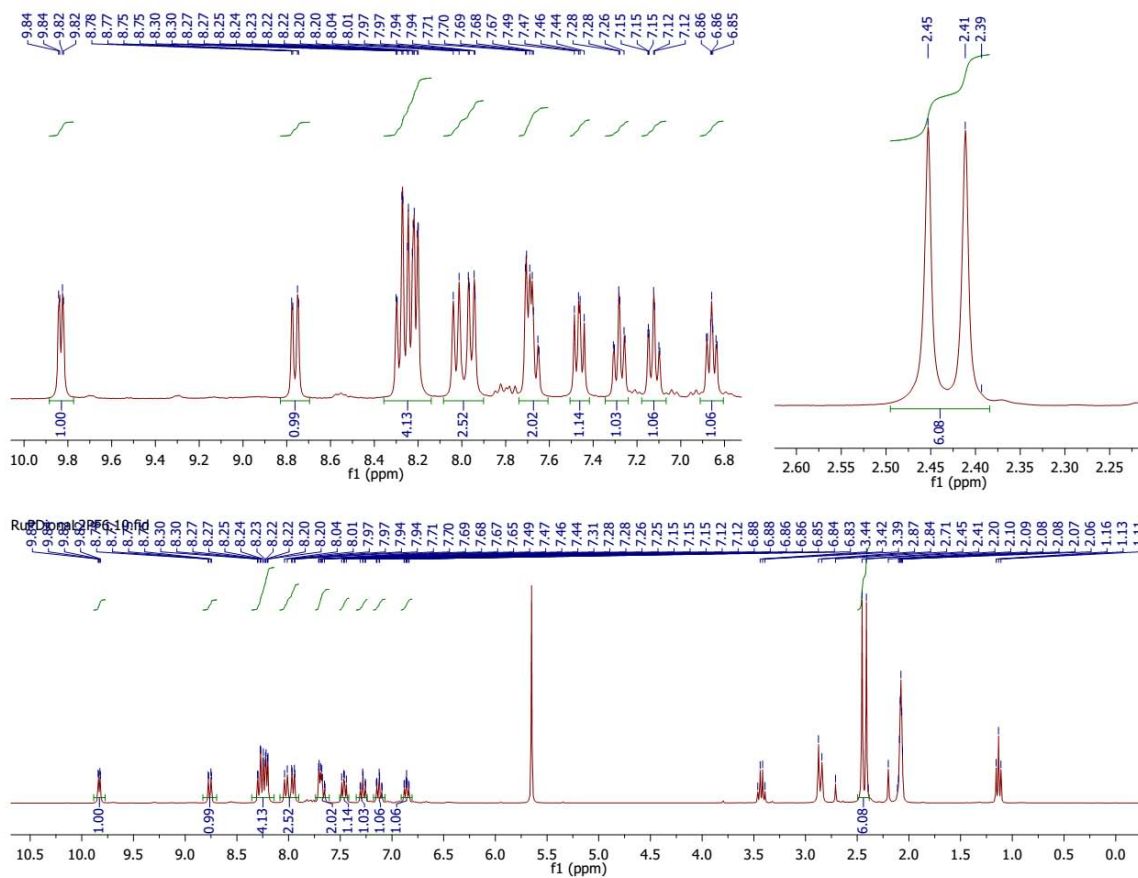
trans-[Ru(phpy)(phen)(CH₃CN)₂]PF₆ (5). RMN ¹H en CD₃CN



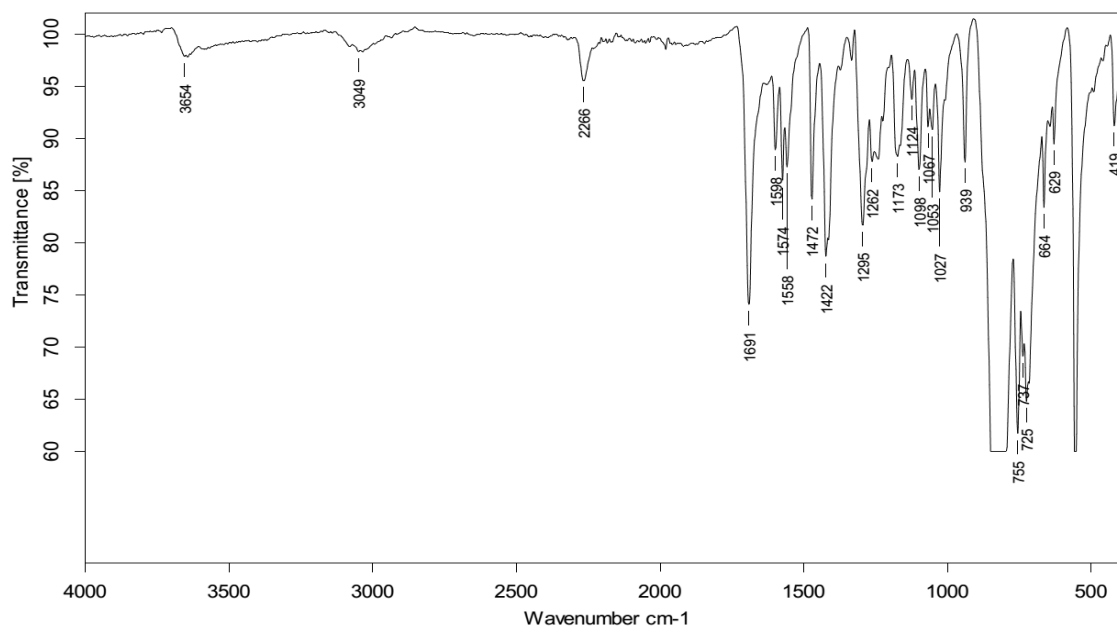
trans-[Ru(phpy)(phen)(CH₃CN)₂]PF₆ (5). Espectro de infrarrojo en sólido



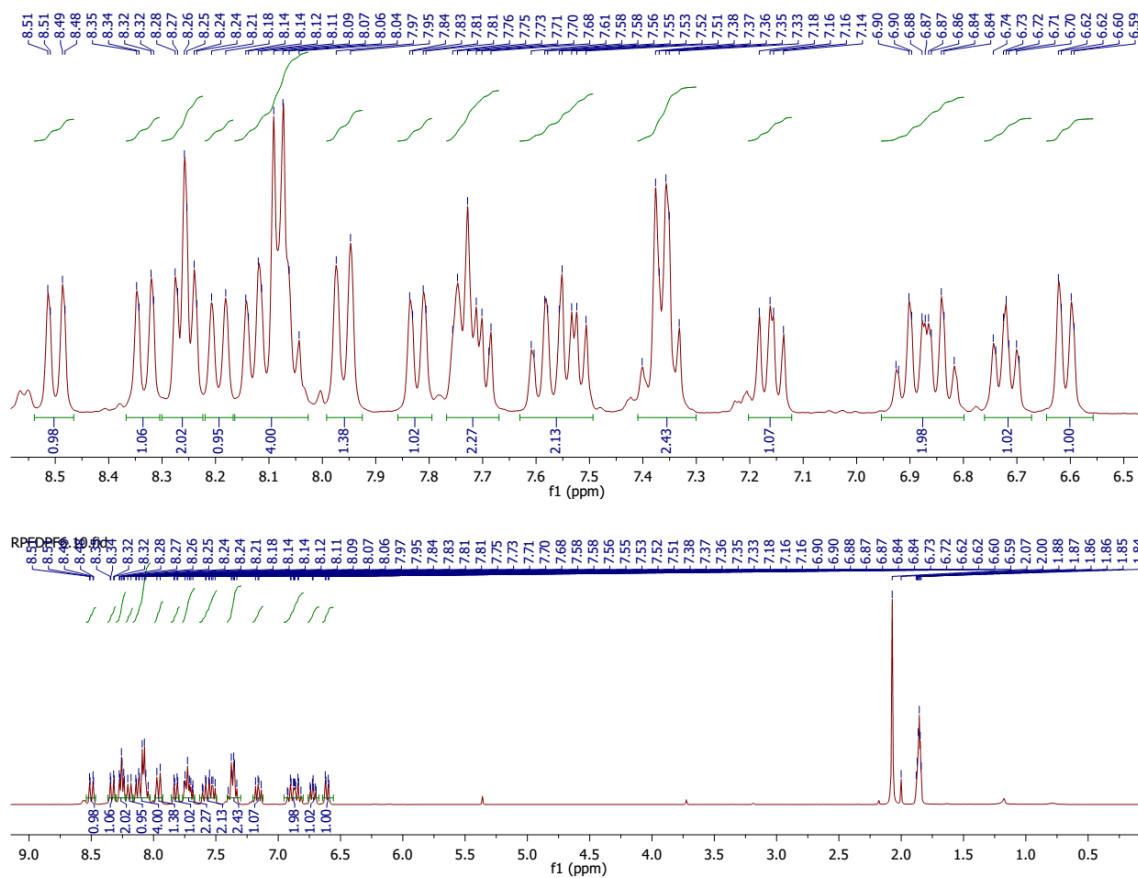
cis-[Ru(phpy)(phenCO)(CH₃CN)₂]PF₆ (6). RMN ¹H en CD₃CN



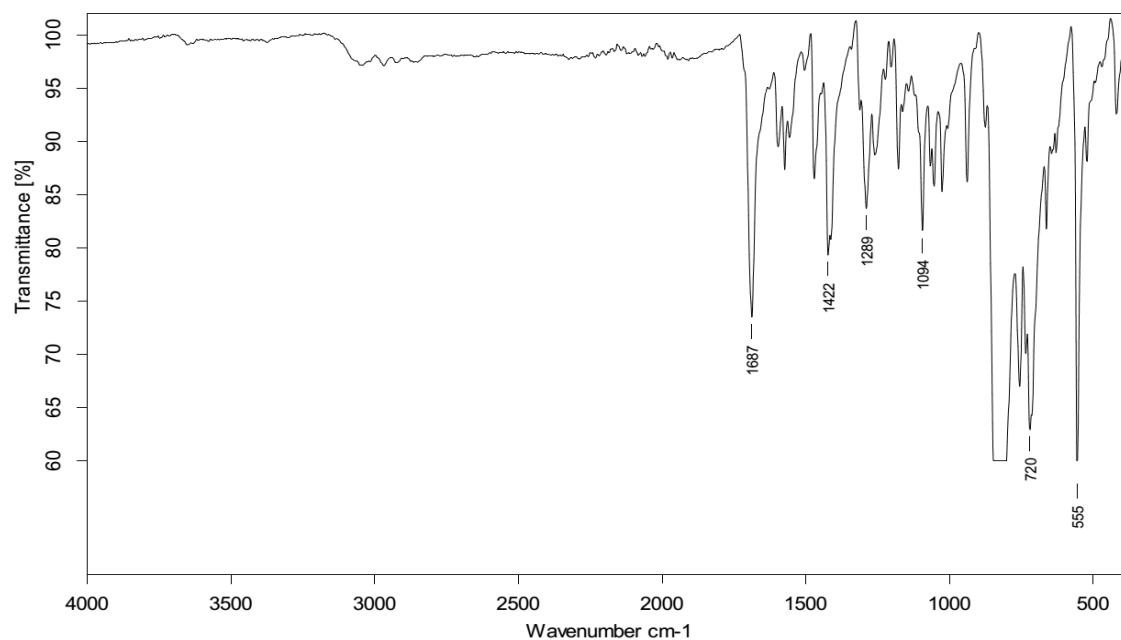
cis-[Ru(phpy)(phenCO)(CH₃CN)₂]PF₆ (6). Espectro de infrarrojo en sólido.



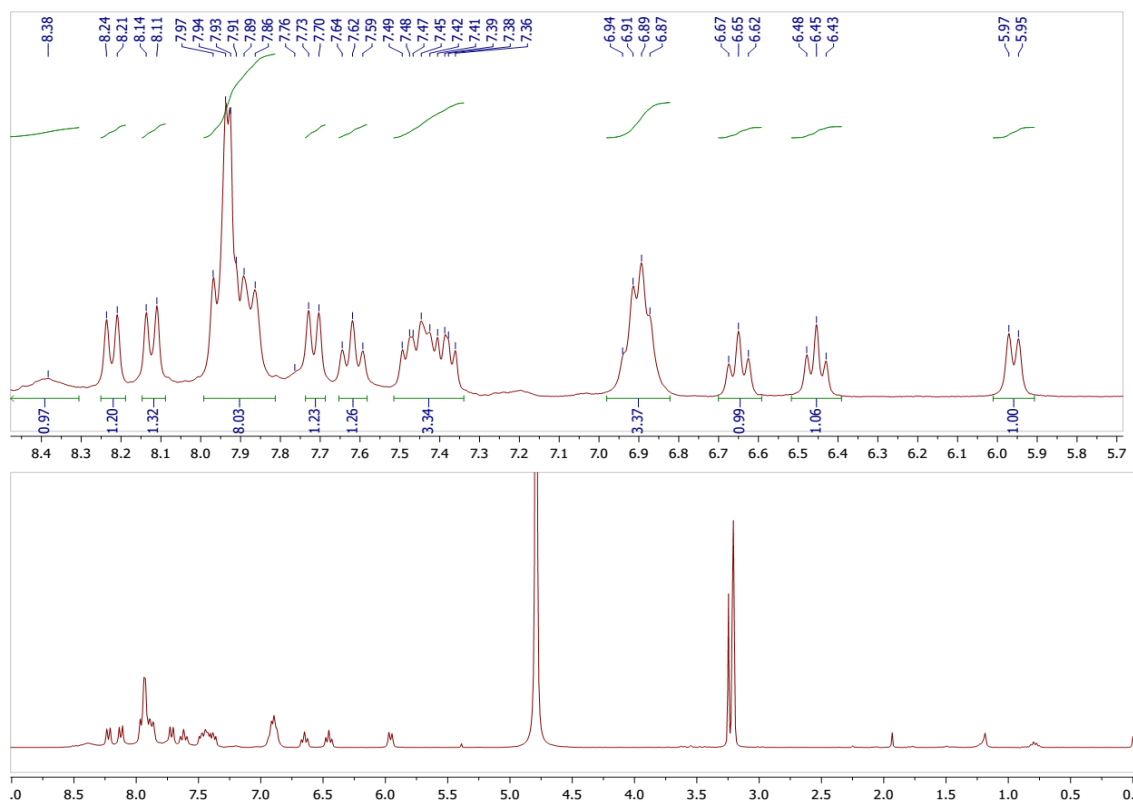
***trans*-[Ru(phpy)(phen)(phenCO)]PF₆ (7). RMN ¹H en CD₃CN**



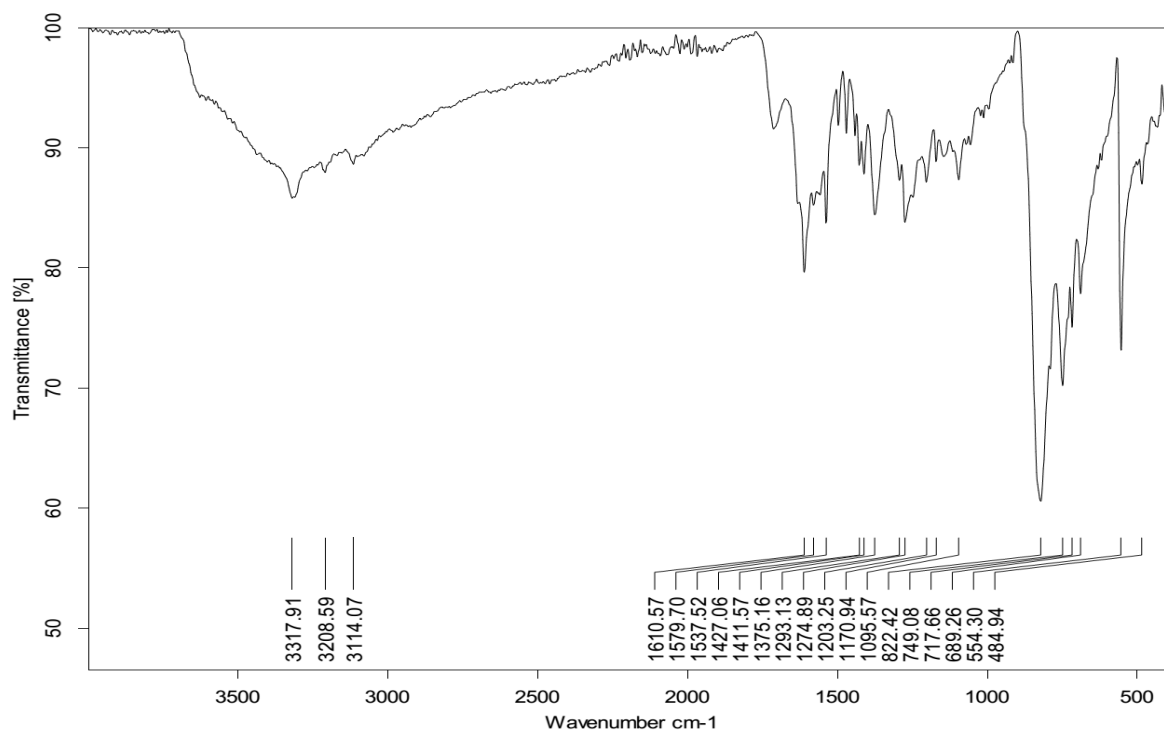
***trans*-[Ru(phpy)(phen)(phenCO)]PF₆ (7). Eespectro de infrarrojo en sólido**

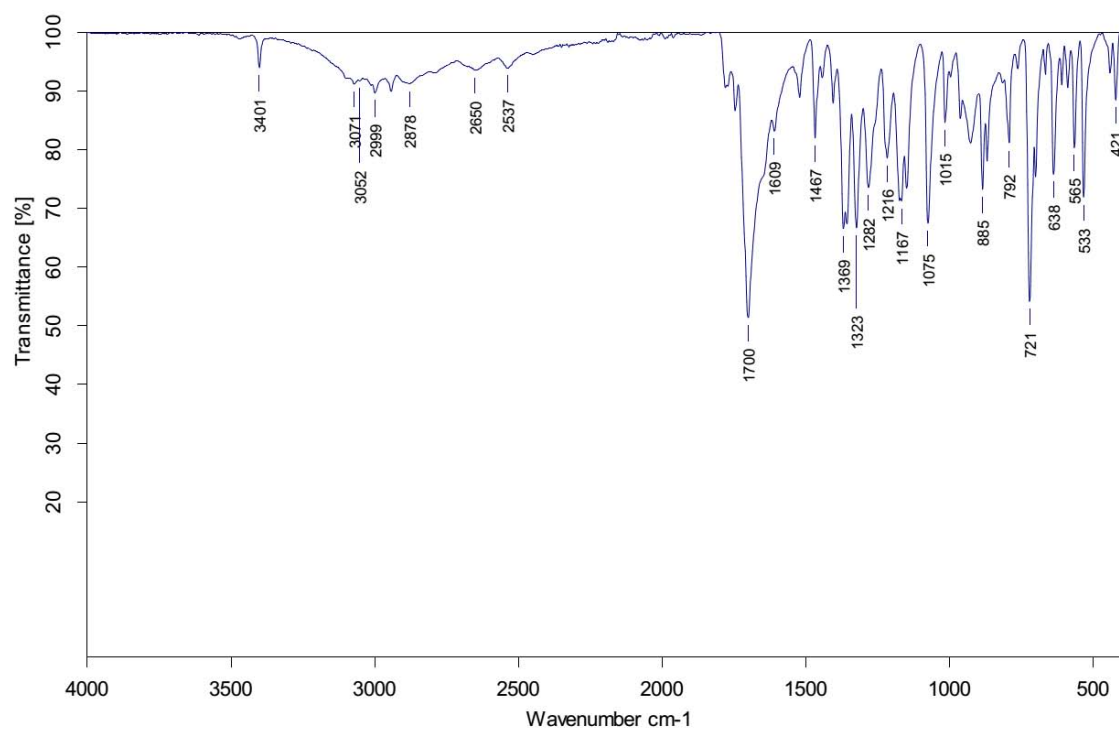
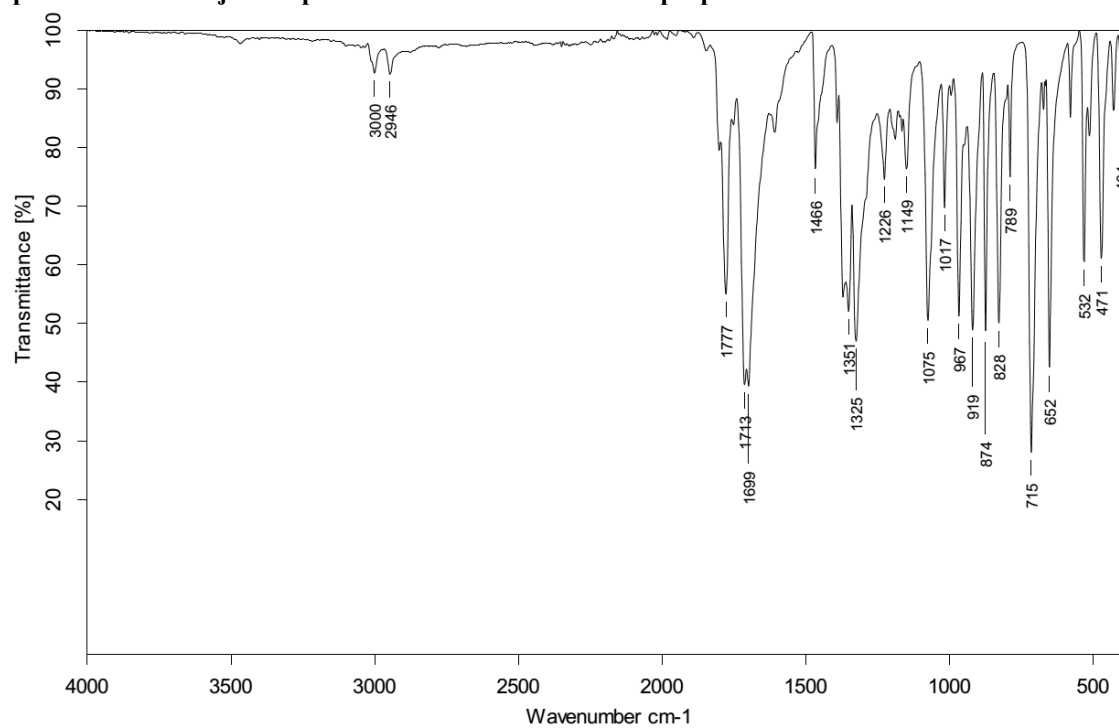


[Ru(phpy)(phen)(bpyCO₂H)]PF₆ (8). RMN ¹H en CD₃CN



[Ru(phpy)(phen)(bpyCO₂H)]PF₆ (8). Espectro de infrarrojo en sólido

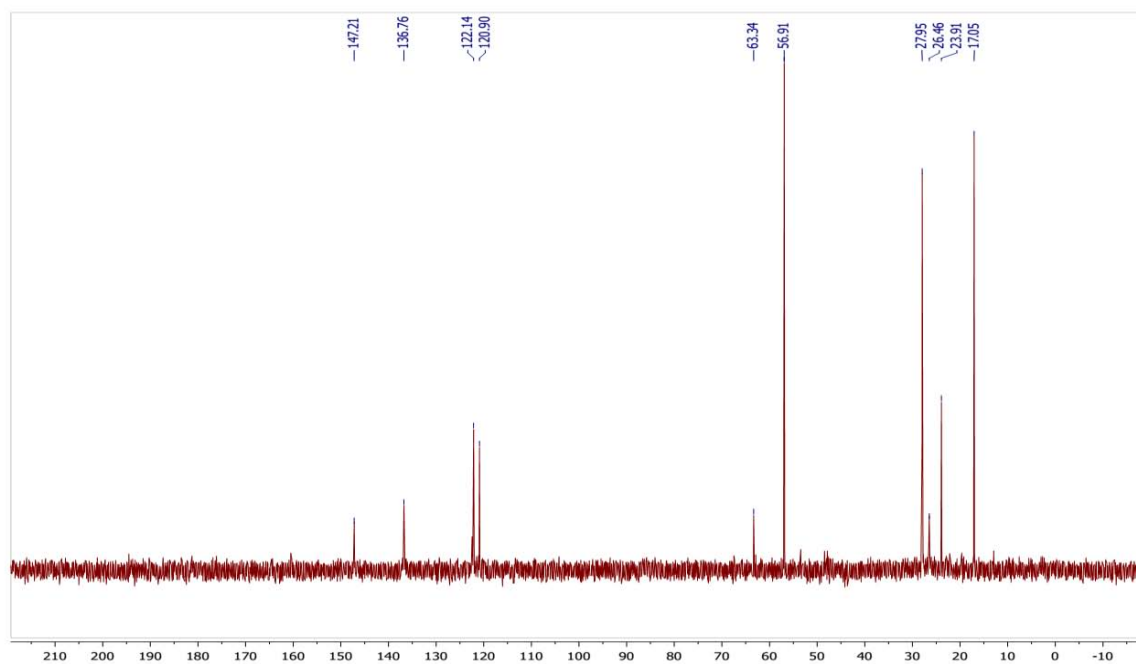


Espectro de infrarrojo compuesto 11 ácido 2-ftalamidopropiónico**Espectro de infrarrojo compuesto 12 cloruro de 2-ftalamidopropanoilo**

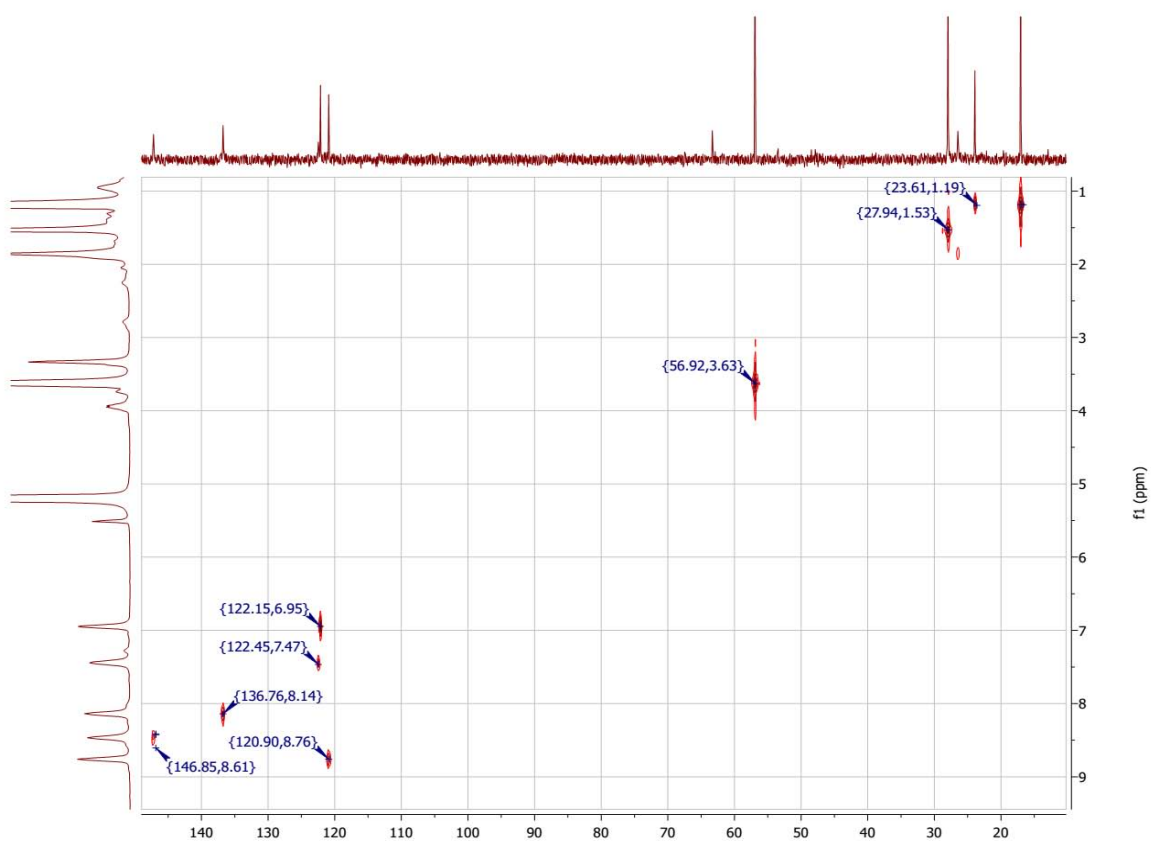
bpyTAML RMN HETCOR

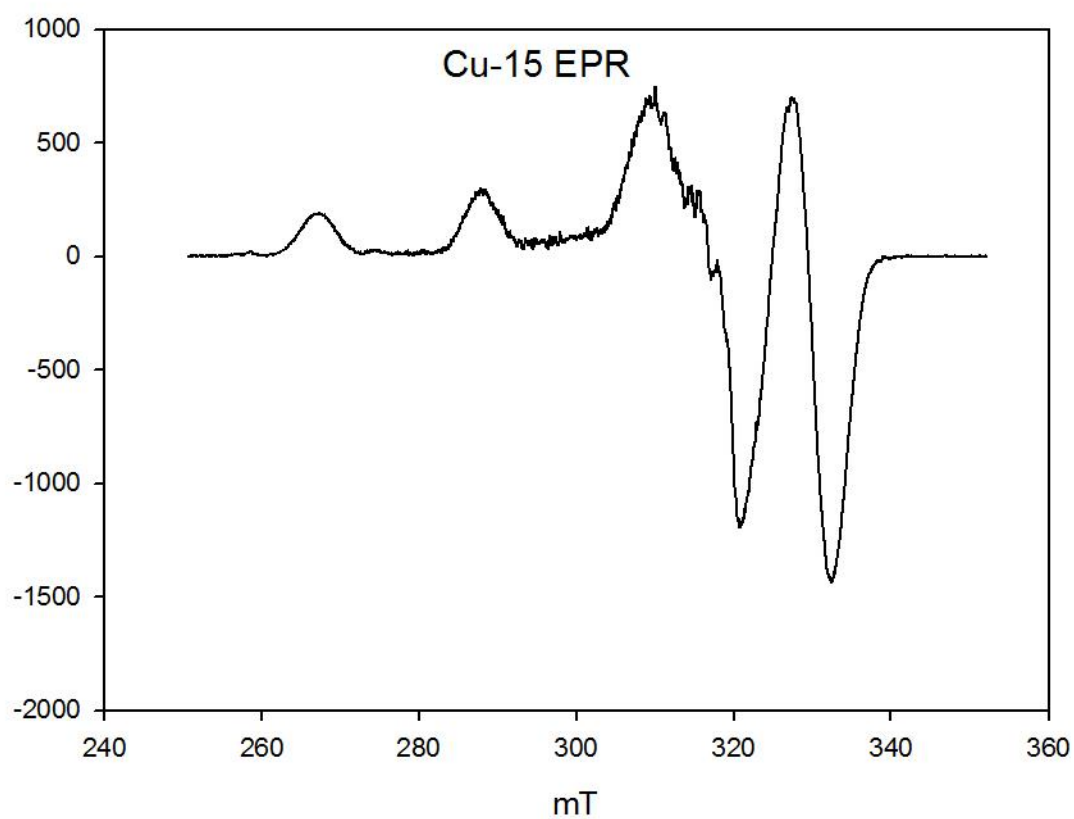
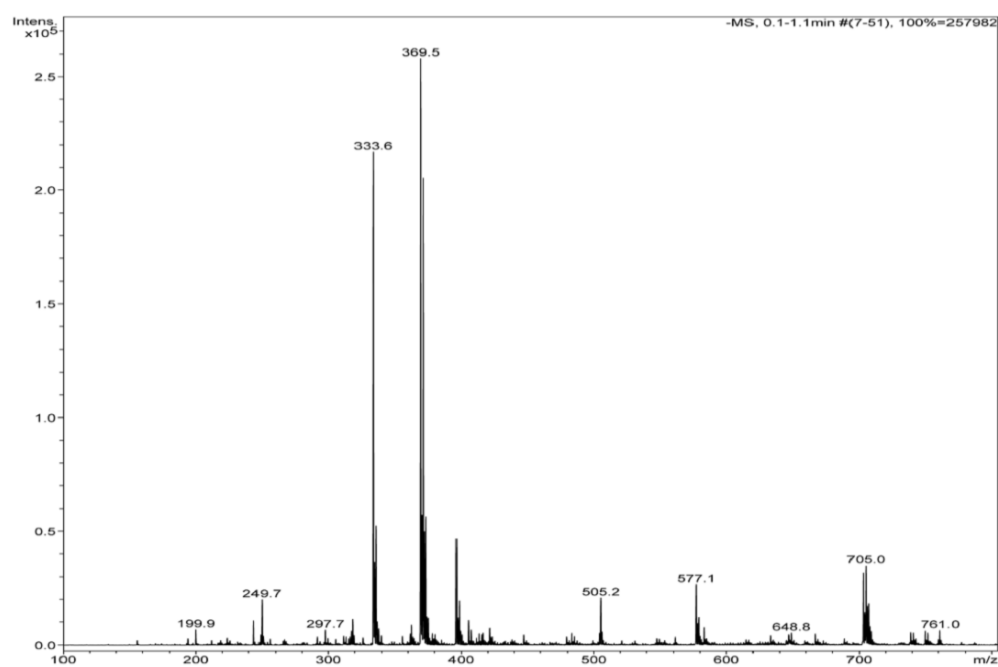


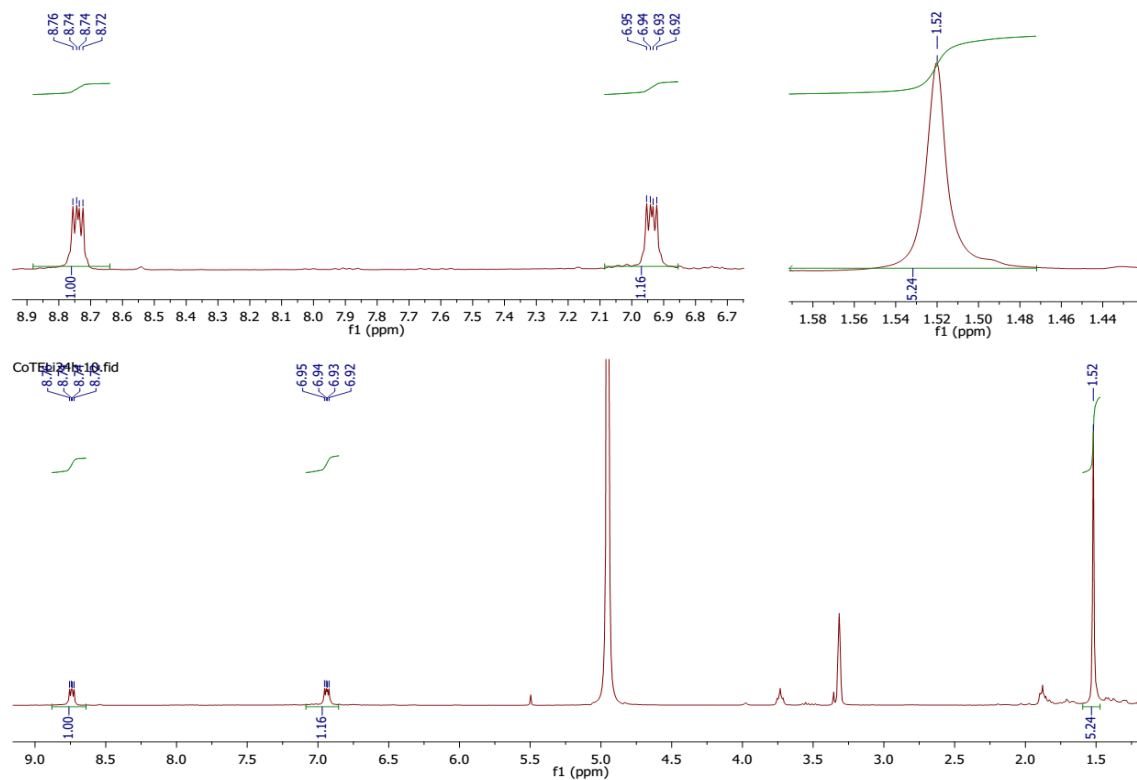
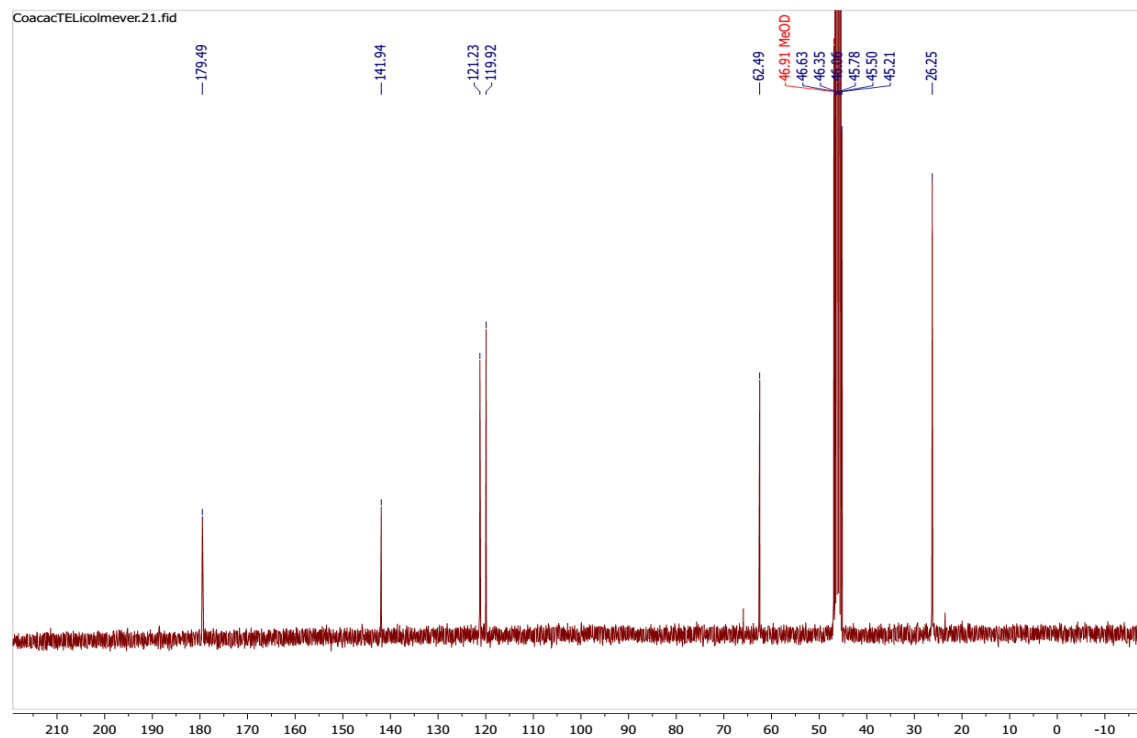
Co-bpyTAML RMN DEPT

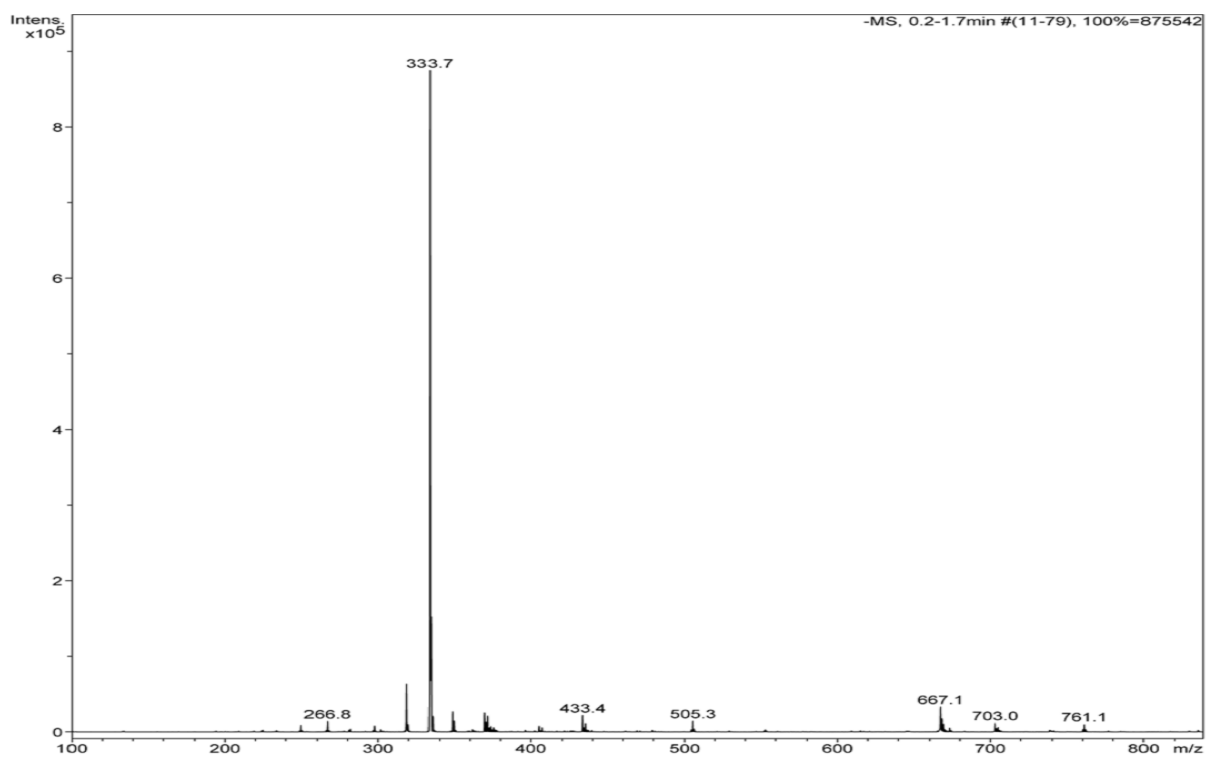


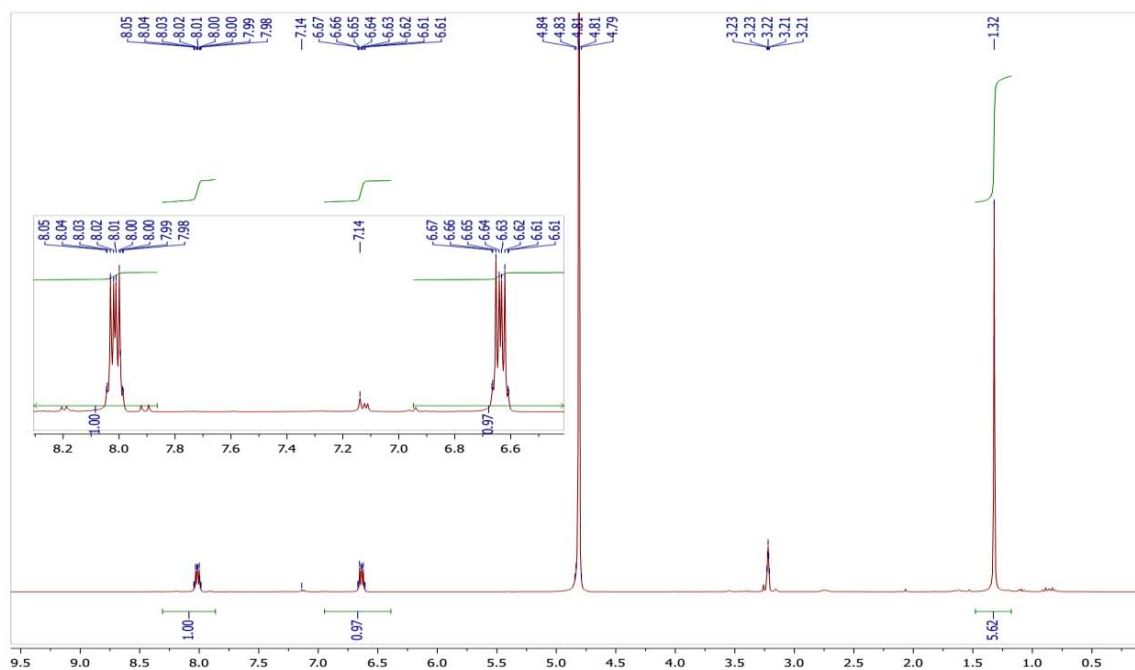
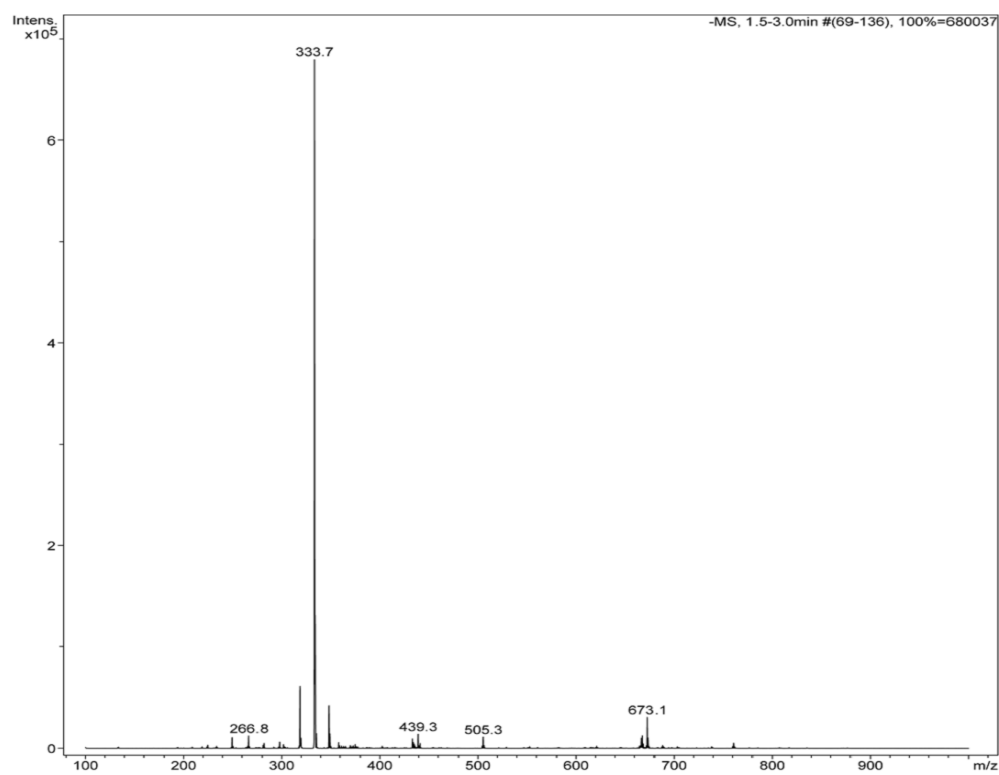
Co-bpyTAML RMN HETCOR



Cu-15. EPR CH₃OH, 77K.**Cu-15 espectrometría de masas ESI⁺**

Co-15 RMN ^1H CD_3OD Co-15 RMN ^{13}C CD_3OD 

Co-15 espectrometría de masas ESI⁺

Ni-15 RMN ^1H CD_3OD Ni-15 espectrometría de masas ESI^+ 

2-Phenylpyridine ruthenacycles as effectors of glucose oxidase activity: inhibition by Ru^{II} and activation by Ru^{III}

Rafael Omar Saavedra Díaz · Ronan Le Lagadec ·
Alexander D. Ryabov

Received: 24 January 2013 / Accepted: 28 March 2013 / Published online: 27 April 2013
© SBIC 2013

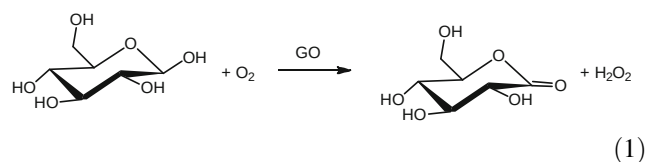
Abstract Cyclometalated Ru^{II} derivatives of 2-phenylpyridine (Hphpy) [Ru(phpy)(bpy)₂]Cl (**1a**) and [Ru(phpy)(phen)₂]Cl (**1b**) (bpy is 2,2'-bipyridine, phen is 1,10-phenanthroline) behave as noncompetitive inhibitors of glucose oxidase from *Aspergillus niger* in the enzyme-catalyzed oxidation of D-glucose by O₂ into the corresponding lactone at pH 5.0 and 25 °C. The enzymatic activity has been measured by monitoring the O₂ consumption. The inhibition constants *K_i* are 0.036 and 0.017 M for **1a** and **1b**, respectively, indicating that **1b** inhibits the enzymatic activity more efficiently than **1a**. The well-known coordination compound [Ru(bpy)₃]Cl₂ (**2**) behaves, in contrast, as a competitive inhibitor, with *K_i* = 0.018 M under the same conditions. The monophasic consumption of O₂ in the case of **1a**, **1b**, and **2** is replaced by a distinct two-phase kinetics in the presence of the cyclometalated Ru^{III} compound [Ru(phpy)(bpy)₂]Cl₂ (**3**), which was obtained from **1a** in the presence of a large excess of H₂O₂ and the iron TAML activator. Interestingly, the rates of the first and the second phases are influenced by

3 in a different way. The rate of the first phase is noticeably higher in the presence of Ru^{III}, although the dependence is nonmonotonic and maximal acceleration is observed at the lowest loadings of **3**. The rate of the second phase decreases monotonically on increasing the concentration of the ruthenium complex in solution. The nonmonotonic action of **3** was confirmed by using the doubly cyclometalated Ru^{III} derivative [Ru(phpy)₂(bpy)]Cl. The diverse rate variations induced by **3** accounted for acceleration by Ru^{III} of the O₂ reduction by the reduced form of glucose oxidase during the first phase, which ceases after the enzymatic reduction of Ru^{III} to the Ru^{II} species, the latter behaving similarly to **1a** as the inhibitor of the enzyme.

Keywords Ruthenium · Cyclometalation · Glucose oxidase · Kinetic inhibition · Activation

Introduction

Studies of various interactions of inorganic and organometallic compounds with glucose oxidase (GO) from *Aspergillus niger*, the enzyme that catalyzes the oxidation of β-D-glucose by O₂ to the corresponding lactone via Eq. 1 [1], have a long history [2].



Along with other organometallics, ruthenium [3] and osmium [4] complexes appear to be similarly advantageous compared with earlier introduced ferrocene derivatives [5]

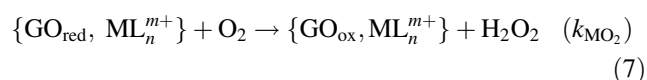
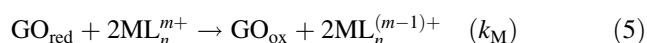
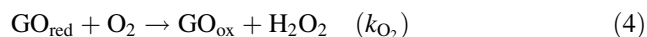
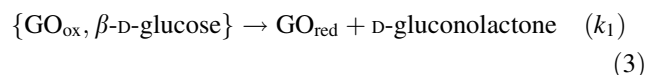
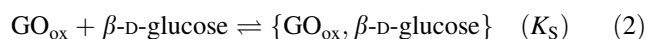
Dedicated to the memory of a big man, Ivano Bertini, the founder of *Journal of Biological Inorganic Chemistry*.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00775-013-0999-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

R. O. Saavedra Díaz · R. Le Lagadec
Instituto de Química, UNAM, Circuito Exterior s/n,
Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., México
e-mail: ronan@unam.mx

A. D. Ryabov (✉)
Department of Chemistry, Carnegie Mellon University,
4400 Fifth Avenue, Pittsburgh, PA 15213, USA
e-mail: ryabov@andrew.cmu.edu

in their ability to oxidize the reduced active site of GO and as such appear to be involved in the mediated electron transfer from the reduced flavin adenine dinucleotide (FADH₂) at an electrode [5]. The mechanism of catalysis by GO consists of two processes, viz., the oxidation of β-D-glucose by the enzyme in the resting state (GO_{ox}; Eqs. 2, 3) followed by the oxidation of the reduced enzyme (GO_{red}) by O₂ (Eq. 4), leading to hydrogen peroxide [1].



Metal complexes—ferrocene derivatives, ruthenium, and osmium compounds—are capable of reoxidizing GO_{red} instead of dioxygen via the step shown in Eq. 5, which is usually a first-order reaction in both GO_{red} and ML_n^{m+}. Quite remarkably, the second-order rate constants *k_M*, particularly in the case of cyclometalated ruthenium [6] and osmium [7, 8] species, may exceed *k_{O₂}*, which equals 1.6 × 10⁶ M^{−1} s^{−1} under the optimal conditions [9]. In many instances, reduced ML_n^{m+} species are reoxidizable electrochemically to ML_n^{m+}, and therefore bioamperometric monitoring of D-glucose, in particular, as well as other analytes in the presence of corresponding oxidases is feasible.

The reduced enzymatic active sites are reoxidized by ML_n^{m+} although ML_n^{(m−1)+} species are inactive. Correspondingly, ML_n^{m+} complexes are, to a certain extent, substrates of enzymes, which possess a definite affinity for the enzymatic active sites. Inactive reduced complexes of the form ML_n^{(m−1)+} are structurally similar to ML_n^{m+}; they differ just in the overall charge. This structural similarity suggests that reduced ML_n^{(m−1)+} species may bind reversibly to enzymes and affect their catalytic activity, particularly the ability to reduce dioxygen. It is thus desirable to know to what extent ML_n^{(m−1)+} complexes can retard the activity of oxidoreductases. Therefore, in this work we report results of studies of inhibition of dioxygen uptake by GO from *Aspergillus niger* by cyclometalated Ru^{II} complexes **1a** and **1b** (Fig. 1), which in contrast to their Ru^{III} counterparts cannot reoxidize GO_{red}. The structurally similar Ru^{II} complex **2**, which does not have a cyclometalated ligand, has also been investigated for comparison. We have found that Ru^{II} compounds **1a**, **1b**, and **2** retard the reduction of O₂, although the Ru^{III} derivative of **1a**, complex **3** (as well as **4**), increases the speed of O₂

uptake. Coordinatively saturated, resistant to ligand exchange cyclometalated Ru^{II} complexes have recently been discovered as potential substitutes for cisplatin in the cancer therapy [10, 11]. Their inertness in ligand exchange/substitution allows us to hypothesize on the operative anticancer mechanism, which may be other than through the binding of complexes to DNA. It could rather be related to the activity of caspase 8 and generation of reactive oxygen species (ROS) [12]. ROS are produced and quenched by redox-active proteins and enzymes. Cyclometalated ruthenium complexes may affect the performance of these biomolecules in various ways. Knowledge of general features of these effects might be key for understanding mechanisms of action of cycloruthenates as anticancer drugs. Correspondingly, in this work we have considered GO as a model oxidoreductase enzyme to study the effects of ruthenium complexes such as **1a**, **1b**, **2**, **3**, and **4** (Fig. 1) on the speed of enzymatic reduction of dioxygen.

Results

General considerations and inhibition of GO by ruthena(II)cycles **1a** and **1b**

Provided the mechanism displayed in Eqs. 2–4 is operative, the rate of dioxygen reduction is given by Eq. 8, which is a variant of the Michaelis–Menten equation with *V_m* = *k₁k_{O₂}*[O₂][E]/(*k₁* + *k_{O₂}*[O₂]) and *K_m* = *k_{O₂}K_S*[O₂]/(*k₁* + *k_{O₂}*[O₂]):

$$-\frac{d[\text{O}_2]}{dt} = \frac{\frac{k_1 k_{\text{O}_2} [\text{O}_2]}{k_1 + k_{\text{O}_2} [\text{O}_2]} [\text{E}][\text{S}]}{\frac{k_{\text{O}_2} K_S [\text{O}_2]}{k_1 + k_{\text{O}_2} [\text{O}_2]} + [\text{S}]} \quad (8)$$

This allows us to use a standard approach based on the Michaelis–Menten equation for analysis of the inhibition of GO activity by the Ru^{II} compounds presented in Fig. 1. Figure 2a shows dependencies of steady-state rates of O₂ consumption as a function of D-glucose concentration in the absence and in the presence of different concentrations of ruthena(II)cycle **1a**. There is a distinct retardation of the activity of GO by **1a**, the effect increasing with increasing inhibitor concentration. The corresponding Lineweaver–Burk plots shown in Fig. 2b confirm that (1) the reaction follows Michaelis–Menten kinetics and (2) the noncompetitive mechanism of inhibition is operative because the straight lines intersect at a common point on the *x* axis [13]. The values of the calculated effective maximal rates (*V_{m,eff}*) and effective Michaelis constants (*K_{m,eff}*) in Table 1 confirm the mechanistic conclusion because the *K_{m,eff}* values are essentially independent of the concentration of **1a**, but the *V_{m,eff}* values decrease

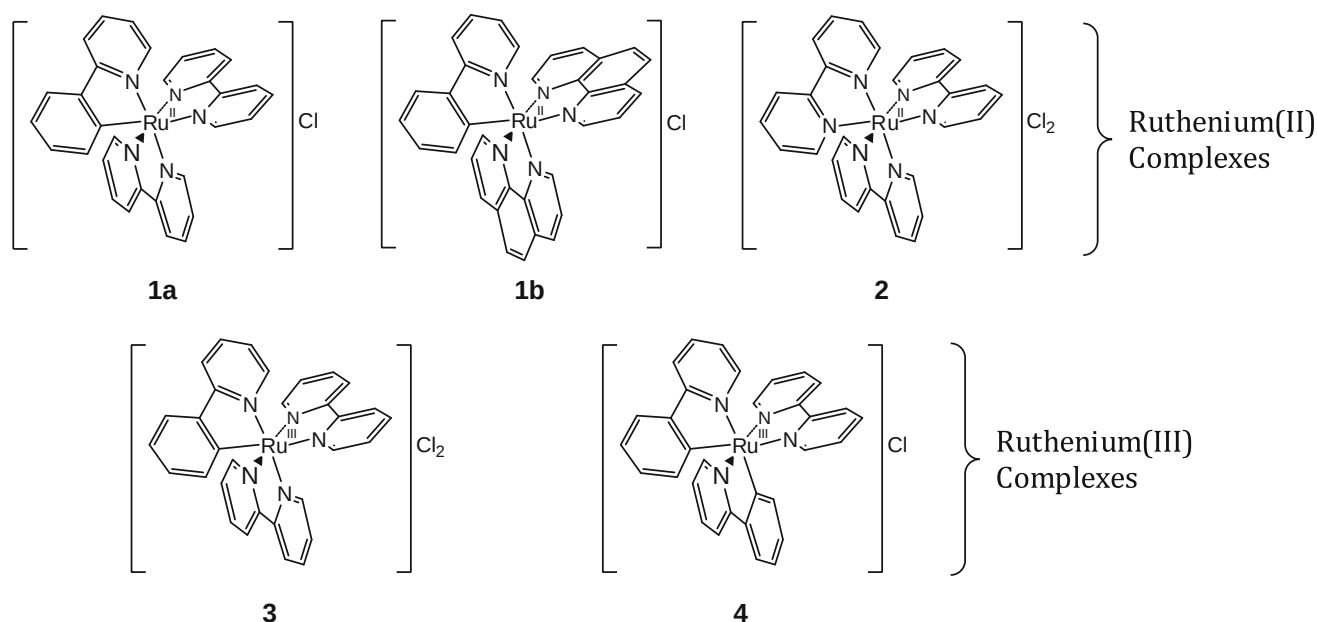


Fig. 1 Complexes used in this work: ruthenium(II) cyclometalated compounds **1a** and **1b** with a σ Ru–C bond, coordination compound **2**, and ruthenium(III) cyclometalated compounds **3** and **4**

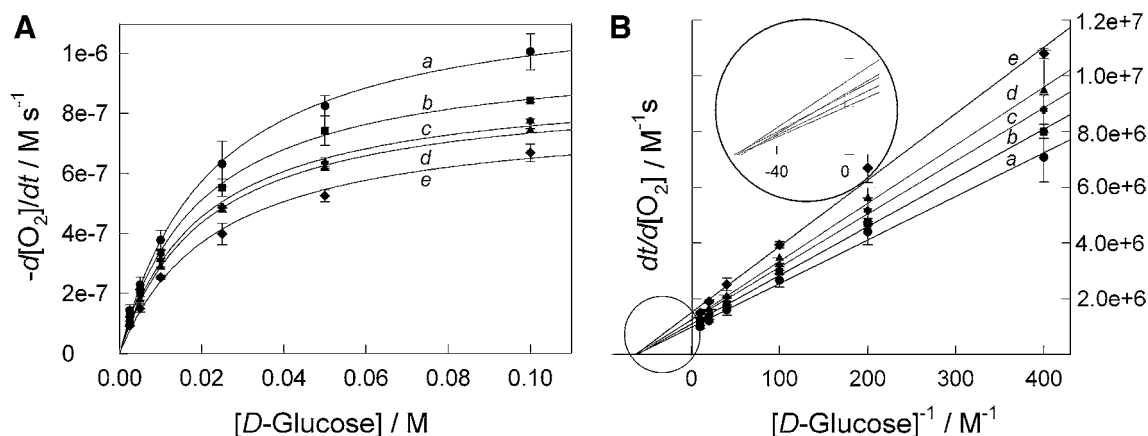


Fig. 2 a Steady-state rates of dioxygen uptake by glucose oxidase (GO) (1×10^{-8} M) as a function of D-glucose concentration at various concentrations of **1a** (0, 0.001, 0.004, 0.009, and 0.016 M from *a* to *e*, respectively) at pH 5.0 (0.05 M phosphate) and 25 °C.

b The corresponding double reciprocal plot showing that the lines intersect the *x* axis at a single point, indicative of a noncompetitive inhibition

systematically with increasing **1a** concentration. The inverse of $V_{m,eff}$ is a linear function of the concentration of **1a** (Fig. S1) and thus an inhibition constant K_i of 0.036 M was calculated because $(V_{m,eff})^{-1} = (V_m)^{-1} (1 + [Ru^{II}]/K_i)$ [13]. The value of K_i indicates comparable affinity of **1a** and D-glucose toward GO because the $K_{m,eff}$ values for D-glucose are in the range of 0.01–0.03 M [1], which agrees with value of 0.016 M found in this work at zero concentration of **1a** (Table 1).

Ruthena(II)cycl **1b** behaves similarly to **1a**, as expected (Fig. S2a). The noncompetitive inhibition scheme was similarly confirmed (Fig. S2b, Table 1). It is though a

slightly better inhibitor of GO than **1a**, as revealed by a smaller value of K_i (0.017 M) calculated from the corresponding linear plot included in Fig. S1.

Inhibition of GO by tris(2,2'-bipyridine) ruthenium(II) (**2**)

The rate versus D-glucose concentration profiles in Fig. 3a look slightly different from those in Figs. 2a and S2a for ruthena(II)cycles **1a** and **1b**. The Lineweaver–Burk plots in Fig. 3b highlight the origin of dissimilarity, which is a switch from the noncompetitive to competitive inhibition

Table 1 Effective maximal rates and Michaelis constants for the oxidation of D-glucose by O₂ catalyzed by glucose oxidase from *Aspergillus niger* calculated using the Lineweaver–Burk routine from the measured dependence of O₂ consumption in the D-glucose concentration range from 0.0025 to 0.1 M

[Ru ^{II}] (M)	10 ⁷ × V _{m,eff} (M s ^{−1})	10 ² × K _{m,eff} (M)	K _i (M)
1b			
0	10.2 ± 0.1	1.58 ± 0.04	0.017 ± 0.002 ^a
0.0025	9.2 ± 0.2	1.76 ± 0.06	
0.0075	7.6 ± 0.1	1.71 ± 0.04	
0.009	6.5 ± 0.3	1.82 ± 0.09	
1a			
0	10.2 ± 0.1	1.58 ± 0.04	0.036 ± 0.005 ^a
0.001	9.2 ± 0.1	1.59 ± 0.02	
0.0038	8.1 ± 0.1	1.54 ± 0.01	
0.009	7.9 ± 0.1	1.64 ± 0.04	
0.016	6.6 ± 0.1	1.58 ± 0.02	
2			
0	21.8 ± 0.3	2.31 ± 0.03	0.018 ± 0.006 ^b
0.0025	21.3 ± 0.1	2.58 ± 0.01	
0.00375	20.2 ± 0.2	2.67 ± 0.03	
0.0050	20.0 ± 0.3	2.85 ± 0.04	
0.0075	20.4 ± 0.2	3.24 ± 0.03	

The conditions were as follows: 1 × 10^{−7} M glucose oxidase for **1a** and **1b** and 2 × 10^{−7} M glucose oxidase for **2**, pH 5.0 (0.05 M phosphate), 25 °C

^a Noncompetitive scheme

^b Competitive scheme

mechanism. In fact, the straight lines intersect virtually at a single point on the y axis (Fig. 3b, inset), the V_{m,eff} values are unaffected by the presence of **2** (Fig. S1), but the effective Michaelis constants K_{m,eff} have a tendency to

increase with increasing concentration of **2** (Fig. S3, Table 1). In the case of the competitive inhibition, $K_{m,eff} = K_m (1 + [Ru^{II}]/K_i)$ [13], and therefore K_i = 0.018 M was calculated from the plot of K_{m,eff} versus Ru^{II} concentration (Fig. S3). Despite different inhibition schemes being realized, the values of the inhibition constants K_i summarized in Table 1 are similar for cycloruthenated species **1** and noncyclometalated compound **2**. It is also worth mentioning that the affinity of ruthenium compounds **1** and **2** in terms of K_i is similar to that of D-glucose in terms of K_m.

Activation of GO by ruthena(III)cyclc **3**

The kinetic curves for the GO-catalyzed reduction of O₂ both in the absence and in the presence of Ru^{II} complexes **1** and **2** are typical of enzymatic processes and contain significant steady-state portions as exemplified in Fig. 4. However, the kinetics change noticeably in the presence of ruthena(III)cyclc **3**. The entire kinetic curve appears to be divided into two phases by a break point (Fig. 4). The rate of O₂ consumption during the first phase, which becomes longer on increasing the concentration of **3**, is higher than the rate in the absence of the Ru^{III} complex. The rates as a function of D-glucose concentration were measured at variable loadings of Ru^{III}. The data in Fig. 5 indicate that Ru^{III} enhances the GO activity, although the activating effect is nonmonotonic, which is very unusual. In fact, the maximal acceleration is observed at the lowest loading of Ru^{III} (Fig. 5). As before, the data were analyzed using the Lineweaver–Burk routine, and the corresponding values of V_{m,eff} and K_{m,eff} are summarized in Table 2. Although these values are determined with a lower accuracy than those in the case of the inhibiting Ru^{II} compounds (for reasons, see below), one may conclude that Ru^{III} increases V_{m,eff} although K_{m,eff} remains virtually unchanged as in the

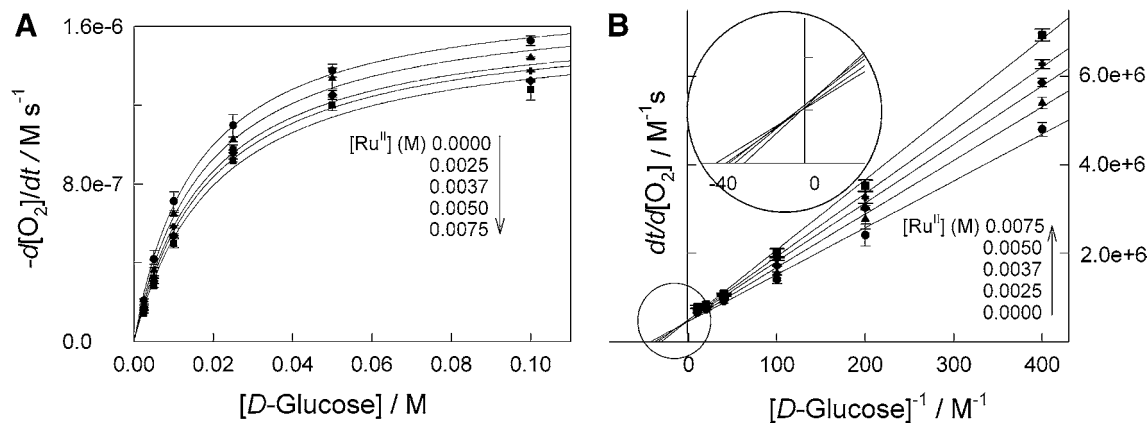


Fig. 3 **a** Steady-state rates of dioxygen uptake by GO (2 × 10^{−8} M) as a function of D-glucose concentration at various concentrations of **2** (0, 0.0025, 0.0037, 0.0050, and 0.0075 M) at pH 5.0 (0.05 M

phosphate) and 25 °C. **b** The corresponding double reciprocal plot showing that the lines intersect the y axis at a single point, which is consistent with a competitive inhibition

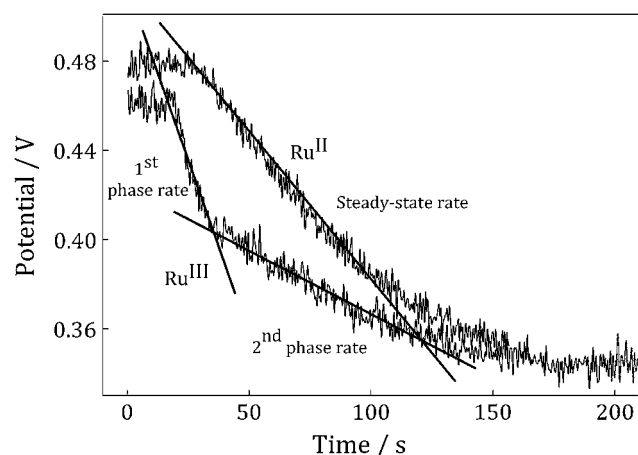


Fig. 4 Dioxygen uptake by GO (2×10^{-8} M) in the presence of Ru^{II} and Ru^{III} complexes (0.0025 M **2** and 0.0005 M **3**) at 0.1 M D-glucose, pH 5.0 (0.05 M phosphate), and 25 °C. Solid lines indicate the how the corresponding rates of O₂ uptake were measured

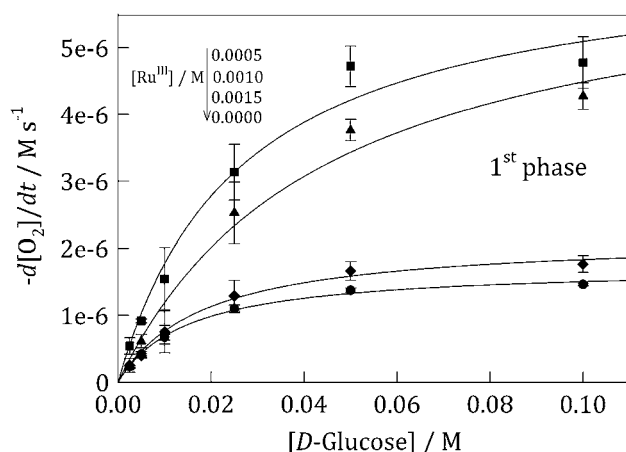


Fig. 5 Rates of the first phase of dioxygen uptake by GO (2×10^{-8} M) as a function of D-glucose concentration at various concentrations of Ru^{III} complex **3** (0, 0.0005, 0.001, and 0.0015 M) at pH 5.0 (0.05 M phosphate) and 25 °C

case of **1a** (Table 1). This observation suggests that Ru^{III} does not compete with D-glucose for the binding site but enhances the effective catalytic rate constant.

Table 2 Effective maximal rates and Michaelis constants for the first and second phases of the oxidation of D-glucose by O₂ catalyzed by glucose oxidase from *Aspergillus niger* in the presence of Ru^{III}

[Ru ^{III}] (M)	1st phase		2nd phase	
	$10^7 \times V_{m,eff}$ (M s ⁻¹)	$10^2 \times K_{m,eff}$ (M)	$10^7 \times V_{m,eff}$ (M s ⁻¹)	$10^2 \times K_{m,eff}$ (M)
0	17.3 ± 0.3	1.51 ± 0.09	17.3 ± 0.3	1.51 ± 0.09
0.0005	64 ± 2	2.6 ± 0.4	11.8 ± 0.5	1.0 ± 0.1
0.0010	64.8 ± 0.4	4 ± 1	11.5 ± 0.7	1.3 ± 0.2
0.0015	22 ± 5	1.8 ± 0.6	11.4 ± 0.8	1.4 ± 0.3

The conditions were as follows: glucose oxidase concentration equal to the concentration of **3**, pH 5.0 (0.05 M phosphate), 25 °C

The rates of the second phase, which were measured as shown in Fig. 4, reveal the opposite trend. As in the case of complexes **1a** and **1b** introduced to the reaction mixture directly, there is systematic rate retardation on increasing the ruthenium loading (Fig. 6). Similarly determined values of $V_{m,eff}$ and $K_{m,eff}$ are collected in Table 2 as well. If these data are compared with the corresponding data for **1a** in Table 1, one may see a clear match, i.e., the values of $K_{m,eff}$ do not change although the $V_{m,eff}$ values decrease on increasing the effector concentration as anticipated for the noncompetitive mechanism. In other words, the second phase in the case of Ru^{III} resembles the inhibiting effect of Ru^{II} complex **1a** and therefore the break in Fig. 4 occurs presumably because of the conversion of Ru^{III}, which is an activator of GO activity, into Ru^{II}, which is an inhibitor of GO activity.

There is nothing unexpected in the reduction of Ru^{III} to Ru^{II} by the GO/D-glucose system via Eq. 5. More interesting is the activation of GO by Ru^{III}. Unusual is the effect itself and its dependence on the concentration of Ru^{III}. Wishing to find out how general the effect is, we tested doubly cyclometalated Ru^{III} complex **4**, which differs from **3** by a significantly reduced, by about 0.6 V, reduction potential for the Ru^{II/III} couple [14]. The data in Fig. 7 show that complex **4** behaves similarly to complex **3**. It splits the entire process into two phases. The first phase is noticeably faster in the presence of Ru^{III} and its smaller loadings cause larger accelerations, i.e., the effect is nonmonotonic.

The activation of GO by Ru^{III} for both **3** and **4** is observed until all Ru^{III} is enzymatically reduced to Ru^{II}. This means that the activation by Ru^{III} is monitored in the presence of a certain amount of Ru^{II} in the system. Therefore, the activation is always realized along with inhibition. Two opposite phenomena may thus cause lowered accuracy in determining $V_{m,eff}$ and $K_{m,eff}$ during the first phase of dioxygen consumption in the presence of Ru^{III}.

Discussion

Cycloruthenated compounds **1a** and **1b** and tris(bpy) ruthenium(II) complex **2** (bpy is 2,2'-bipyridine) are

complex **3** calculated using the Lineweaver–Burk routine from the measured dependence of O₂ consumption in the D-glucose concentration range from 0.0025–0.1 M

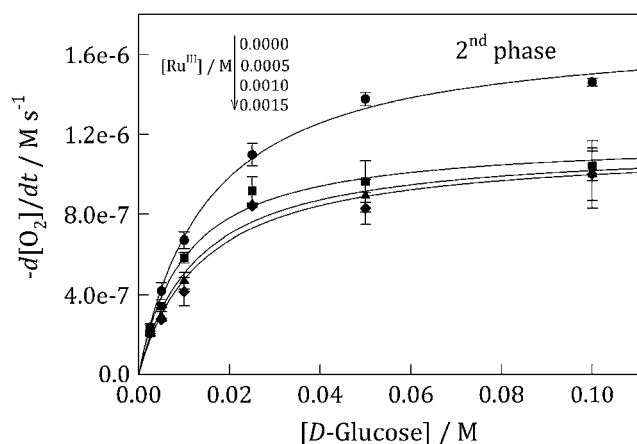


Fig. 6 Rates of the second phase of dioxygen uptake by GO (2×10^{-8} M) as a function of D-glucose concentration at various concentrations of Ru^{III} complex **3** (0, 0.0005, 0.0010, and 0.0015 M) at pH 5.0 (0.05 M phosphate) and 25 °C

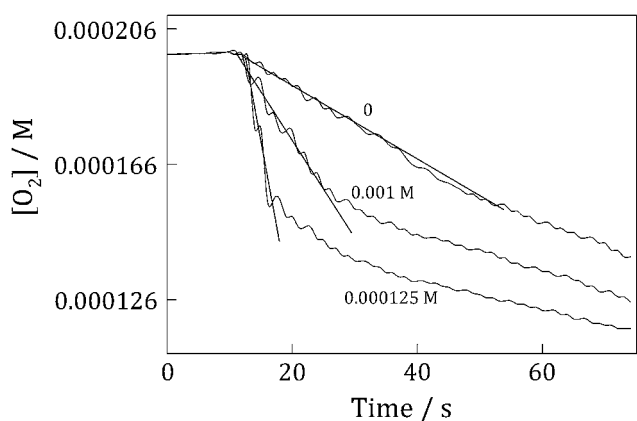


Fig. 7 Dynamics of dioxygen uptake by GO (1×10^{-8} M) in the absence and in the presence of Ru^{III} complex **4** at various concentrations at 0.1 M D-glucose, pH 5.0 (0.05 M phosphate), and 25 °C. Solid lines indicate how the corresponding rates of O₂ uptake were measured

structurally similar but differ in the overall charge, which is +1 for **1a** and **1b** and +2 for **2**. Compounds **1a**, **1b**, and **2** contain Ru^{II}. An extra feature that makes compounds **1a**, **1b**, and **2** different is the nature of their highest occupied molecular orbital. It is essentially based on the ruthenium atom in the case of **2** [15] but in **1a** and **1b** it is significantly extended at the phenyl ring, which is bound to ruthenium via a σ M–C bond, i.e., at the cyclometalated ligand [16]. It is, however, difficult to tell precisely which of the two features causes which mechanism of inhibition is operative, i.e., non-competitive for **1a** and **1b** and competitive for **2**. Increasing the overall charge of **1a** by going to the Ru^{III} derivative **3** does not make ruthenacycle **3** a competitive inhibitor but rather makes it a promoter of the enzymatic activity. Thus, the charge of +2 is probably not a decisive factor for the competitive mechanism of inhibition.

There is an extra feature that differentiates complexes **1a** and **1b** from **2**. The IC₅₀ values with respect to certain cell lines are four orders of magnitude lower for ruthenacycles **1a** and **1b** [11] compared with **2** [17, 18].¹ In fact, this makes the former promising anticancer drugs. The data reported here suggest that the ability of molecules to retard enzymatic activity may not correlate at all with IC₅₀ because the K_i values summarized in Table 1 are close to each other. There might be a relation between IC₅₀ and the mechanism of inhibition, although much deeper studies are required to claim this with certainty.

The activation of GO by Ru^{III} complex **3** is an unexpected challenge. All previous knowledge of interactions of GO_{red} with Ru^{III} suggests rather the opposite effect, i.e., a decrease in the rate of O₂ uptake. If both O₂ and Ru^{III} compete for the reduced active site of the enzyme (Eqs. 4, 5, respectively), the steady-state rate of the enzymatic O₂ reduction should be given by Eq. 9:

$$-\frac{d[\text{O}_2]}{dt} = \frac{k_1 k_{\text{O}_2} [\text{O}_2]}{k_1 + k_{\text{O}_2} [\text{O}_2] + k_{\text{M}} [\text{M}]} [\text{E}] [\text{S}] \quad (9)$$

Under the saturating concentrations of D-glucose, ($[\text{S}] \gg k_{\text{O}_2} K_{\text{S}} [\text{O}_2] / (k_1 + k_{\text{O}_2} [\text{O}_2] + k_{\text{M}} [\text{M}])$), Eq. 9 reduces to Eq. 10, which predicts a hyperbolic decrease of the reaction rate with increasing concentration of Ru^{III} (M in Eqs. 9, 10):

$$-\frac{d[\text{O}_2]}{dt} = \frac{k_1 k_{\text{O}_2} [\text{O}_2]}{k_1 + k_{\text{O}_2} [\text{O}_2] + k_{\text{M}} [\text{M}]} [\text{E}] \quad (10)$$

The effect of Ru^{III} could formally be interpreted in terms of the mechanism summarized by Eqs. 2–4, 6, and 7. For simplicity, Eq. 5 is excluded from the consideration for a moment. The additional steps shown in Eqs. 6 and 7 assume that Ru^{III} is also capable of binding to GO_{red} somewhere away from the active site, i.e., it does not reoxidize GO_{red}, and the {GO_{red}, ML_n^{m+}} associate reduces O₂ with rate constant k_{MO_2} . The steady-state rate of O₂ reduction is then described by Eq. 11:

$$-\frac{d[\text{O}_2]}{dt} = \frac{k_1 (k_{\text{O}_2} K_{\text{M}} + k_{\text{MO}_2} [\text{M}]) [\text{O}_2]}{k_1 K_{\text{M}} + k_1 [\text{M}] + k_{\text{O}_2} [\text{O}_2] K_{\text{M}}} [\text{E}] [\text{S}] \quad (11)$$

As above, at the saturating concentrations of D-glucose ($[\text{S}] \rightarrow \infty$) and provided $k_1 K_{\text{M}} \ll k_1 [\text{M}] + k_{\text{O}_2} [\text{O}_2] K_{\text{M}}$, Eq. 11 reduces to Eq. 12, which predicts the activating effect of Ru^{III} because of the $k_{\text{MO}_2} [\text{M}]$ term in the numerator:

¹ We are grateful to the reviewer for directing our attention to the IC₅₀ issue.

$$-\frac{d[O_2]}{dt} = \frac{k_1(k_{O_2}K_M + k_{MO_2}[M])[O_2][E]}{K_M(k_1 + k_{O_2}[O_2])} \quad (12)$$

Strictly speaking, the step shown in Eq. 5 should also not be ignored completely because, as mentioned earlier, Ru^{III} reduces eventually to Ru^{II} as suggested by the two-phase kinetics such as shown in Figs. 4 and 7. If the step shown in Eq. 5 is taken into account, the activation by Ru^{III} could still be qualitatively observed provided $k_{MO_2} > k_M$.

The main conclusions drawn from this investigation are presented schematically in Fig. 8. Complexes structurally similar to tris(bpy)ruthenium(II) interact/bind with/to different sites of GO and affect differently its ability to catalytically reduce dioxygen. The kinetic data suggest that tris(bpy)ruthenium(II) itself (complex **2**) as a competitive inhibitor should bind somewhere close to the binding site of β -D-glucose. Ruthena(II)cycles **1a** and **1b**, the charge of which is +1 as opposed to +2 for **2**, should bind at some distance from the binding site of β -D-glucose because they behave as noncompetitive inhibitors, i.e., **1a** and **1b** do not affect the affinity of the substrate for the enzyme.

Ruthena(III)cycles **3** and **4**, particularly in low doses, enhance the enzymatic activity. Therefore their localization in the proximity of the β -D-glucose binding site is unlikely. In this case the basic role of Ru^{III} species is to facilitate an electron transfer from $FADH_2$ of GO_{red} at O_2 and therefore we hypothesize that the Ru^{III} complexes may accomplish this via binding closer to the isoalloxazine ring of $FADH_2$ and serving as a functional bridge between $FADH_2$ and O_2 . Needless to say, the exact mechanism of activation of GO by cyclometalated Ru^{III} complexes is not clear at the moment and more effort should be made to clarify it. The effect found here is perhaps related to the recently established phenomenon of “nonmonotonic dose–response curves.” This is when low concentrations of endocrine-disrupting chemicals produce a stronger effect on a human organism than when they are used at higher concentrations

[19–22]. This well-recognized phenomenon is insufficiently understood at a molecular level. The effects of Ru^{III} on GO activity described here exemplify also a nonmonotonic dose response. Perhaps understanding this minor case will help to resolve a significantly more fundamental problem aimed at avoiding hazards from chemicals targeted at the human endocrine system.

In conclusion, the results obtained using a “model” GO enzyme suggest that the cyclometalated Ru^{II} and Ru^{III} complexes have a variety of options in tuning the enzymatic activities of oxidoreductases. GO is an example of a “fine” tuning in terms of the values of K_i , which are not large. However, the result is not striking because the K_i values are of the same order of magnitude as the Michaelis constant K_m for β -D-glucose, a natural substrate of GO. We speculate here that the effects could be significantly larger for enzymes with much higher affinity toward their natural substrates. An example is prolyl hydroxylase domain (PHD) dioxygenase. It is an iron-containing oxidoreductase, the biological role of which is to hydroxylate proline residues of a hypoxia-inducible factor protein in the presence of α -oxoglutarate and dioxygen [23]. High activity of PHD is crucial for suppressing the growth of tumor cells, but its activity is suppressed by ROS. ROS oxidize Fe^{II} of PHD to Fe^{III} and the enzyme loses the ability to activate O_2 . Interestingly, K_m for α -oxoglutarate is 2.2×10^{-7} M [24], which indicates that the affinity of α -oxoglutarate toward PHD is five orders of magnitude higher than that of D-glucose toward GO. Thus, ruthenacycles similar to **1a** and **1b**, which revealed exceptional anticancer activity [11], could be potential efficient effectors of the enzymatic activity of PHD. This statement is now under extensive investigation.

Materials and methods

Chemicals

GO from *Aspergillus niger* was obtained from Sigma (211 U mg^{-1}) and D-glucose was obtained from Acros. KH_2PO_4 , $RuCl_3$, 2-phenylpyridine, 1,10-phenanthroline, bpy, KPF₆, and a Dowex 1X8 200 ion exchange resin were obtained from Sigma-Aldrich. All solvents used were of high-performance liquid chromatography grade from Fischer. Stock solutions of the ruthenium complexes (0.015 M) were prepared by dissolving complexes **1a**, **1b**, **2**, **3**, and **4** in 3.5 mL MeOH and this solution was added to 31.5 mL phosphate buffer of pH 5 (0.05 M). Two stock solutions of D-glucose (0.03 and 0.3 M) in the pH 5 buffer were allowed to stand overnight at 25°C to ensure equilibration between α and β anomers before measurements. A stock solution of GO ($1.5 \times 10^{-7} \text{ M}$) in phosphate buffer

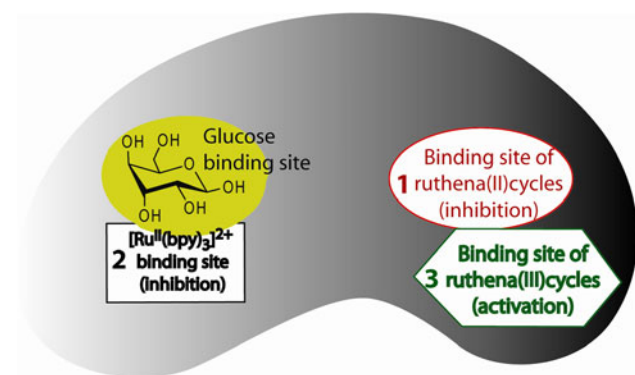


Fig. 8 Various locations of ruthenium complexes within a GO molecule resulting in competitive (**2**) and noncompetitive (**1a**, **1b**) inhibition along with increasing (**3** and **4**) the ability of the enzyme to reduce O_2

of pH 5 (0.05 M) was prepared after determination of the active flavin adenine dinucleotide (FAD). All solutions were kept in a refrigerator. The water-soluble chloro complexes **1a** and **1b** were made from the corresponding $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{NN})_2]\text{PF}_6$ (Hphpy is 2-phenylpyridine, NN is bpy or 1,10-phenanthroline) precursors using a previously described method [25]. The corresponding $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{phpy})(\text{NN})_2]\text{PF}_6$ complex (400 mg) was dissolved in 3 mL of a 1:1 (v/v) MeOH– CH_3CN mixture and the solution was brought on a column charged with 2 g Dowex 1X8 200 ion exchange resin in a Cl^- form. The product was eluted with MeOH. The purple fraction was collected, the solvent was evaporated, and the solid was dried in a vacuum. Anion exchange was quantitative (more than 98 %) and ^1H NMR spectra were similar to those of the PF_6^- compounds. IR analysis showed the disappearance of the PF_6^- band at 831 cm^{-1} . $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{phpy})_2(\text{bpy})]\text{Cl}$ (**4**) was prepared as described elsewhere [14].

Synthesis of $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{phpy})(\text{bpy})_2]\text{Cl}_2$ (**3**)

Complex **1a** (150 mg) and 7.5 mg of iron TAML as a catalyst (obtained from GreenOx Catalysts, Pittsburgh, PA, USA) were dissolved in 20 mL water. A saturated solution of NaCl (2 mL) was added, followed by a slow dropwise addition of 30 % H_2O_2 (1.5 mL). The mixture was stirred overnight, and the product was extracted three times with 10 mL CH_2Cl_2 . The organic layers were dried over sodium sulfate, and the solvent was evaporated to dryness under a vacuum. The resulting paramagnetic purple-red solid was used without further purification. Yield 63 mg (40 %). Positive electrospray ionization $M^+ = 568\text{ m/z}$. The extinction coefficient in the UV–vis spectrum was $7,400\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ at 540 nm in MeOH.

Methods

The UV–vis spectra were obtained using an HP 845x diode-array spectrophotometer. ^1H NMR measurements were made using a Bruker 300 MHz instrument. Fourier transform IR data were collected on a Bruker Alpha-P using ATR. Mass spectra were recorded using a Thermo Fisher LCQ ESI+ ion trap mass spectrometer.

Titration of GO

Enzyme concentrations are expressed as molarity of catalytically active bound FAD. Active FAD was determined by UV–vis spectroscopy using the method of Swoboda and Massey [26]. The absorbance of a 10 μM solution of the GO_{ox} in phosphate buffer of pH 5 (0.05 M) was measured at 450 nm. D-Glucose (20 μL , 0.3 M) was added and the absorbance of GO_{red} was determined. The extinction

coefficient used was $1.41 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$; the amount of active FAD found was 91 %.

Kinetics of enzymatic O_2 uptake

The measurements were made using a homemade Clark electrode with a Mylar surface (YSI, Yellow Springs, OH, USA) equipped with a YSI 5331 probe in a 1.5-mL cell, the temperature of which was controlled at 25 °C. The calibration was performed as follows. The cell was filled with distilled water at 25 °C with stirring and the voltage was recorded. Then the cell was cleaned and filled with the previously deoxygenated water (in a vacuum and bubbled with argon) and a lower voltage was recorded. The drop of 0.06 V was referred to $1.21 \times 10^{-3}\text{ M O}_2$ (O_2 concentration in water at 25 °C). The voltage was related to the concentration of O_2 in solution as suggested elsewhere [27] using the following equation:

$$[\text{O}_2]\text{ (M)} = (V_r - V_0) \frac{0.00121\text{ (M)}}{0.16\text{ (V)}}$$

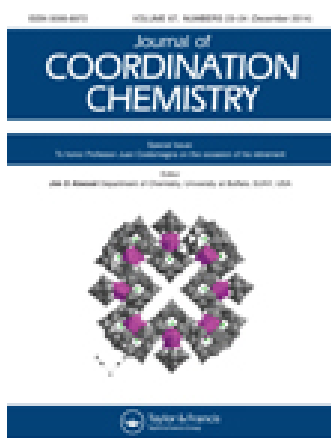
Here V_r and V_0 are the observed potential and the potential at zero O_2 concentration, respectively. The buffer was first added to the cell, followed by a ruthenium complex solution and GO. The solution was stirred, and the recording device was turned on. The reaction was initiated by the addition of a solution of D-glucose after 20 s, and the cell was immediately sealed. Time intervals between readings were in the range from 3 to 10 min depending on the concentration of D-glucose, which was varied in the range from 0.0025 to 0.1 M. Concentrations of O_2 were plotted as a function of time. The corresponding kinetic curves contained typically significant steady-state portions, i.e., O_2 concentrations varied linearly with time (the duration of this phase depends on the concentration of D-glucose). The slopes of the linear portions were associated with steady-state rates $d[\text{O}_2]/dt$ (see Fig. 4) and were used for making the Michaelis–Menten and Lineweaver–Burk plots. The concentrations of ruthenium complexes used are indicated in the figure legends. Each measurement was made at least in duplicate.

Acknowledgments We thank DGAPA (PAPIIT project IN204812) and CONACyT (project 153151 and scholarship to R.-O. S. D.) for financial support. Jose David Vazquez Cuevas is thanked for solving computer-related problems. We are grateful to Michael P. Hendrich (Carnegie Mellon University) for allowing us to use his research facilities and for helpful suggestions.

References

1. Wilson R, Turner APF (1992) Biosens Bioelectron 7:165–185. doi:[10.1016/0956-5663\(92\)87013-F](https://doi.org/10.1016/0956-5663(92)87013-F)
2. Ryabov AD (2004) Adv Inorg Chem 55:201–270. doi:[10.1016/S0898-8838\(03\)55004-8](https://doi.org/10.1016/S0898-8838(03)55004-8)

3. Castillo J, Gáspár S, Leth S, Niculescu M, Mortari A, Bontidean I, Soukharev V, Dorneanu SA, Ryabov AD, Csöregi E (2004) Sens Actuators B Chem 102:179–194. doi:[10.1016/j.snb.2004.04.084](https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.04.084)
4. Heller A (1990) Acc Chem Res 23:128–134. doi:[10.1021/ar00173a002](https://doi.org/10.1021/ar00173a002)
5. Cass AEG, Davis G, Francis GD, Hill HAO, Aston WJ, Higgins IJ, Plotkin EO, Scott LDL, Turner APF (1984) Anal Chem 56:667–671. doi:[10.1021/ac00268a018](https://doi.org/10.1021/ac00268a018)
6. Ryabov AD, Sukharev VS, Alexandrova L, Le Lagadec R, Pfeffer M (2001) Inorg Chem 40:6529–6532. doi:[10.1021/ic010423h](https://doi.org/10.1021/ic010423h)
7. Ceron-Camacho R, Morales–Morales D, Hernandez S, Le Lagadec R, Ryabov AD (2008) Inorg Chem 47:4988–4995. doi:[10.1021/ic800251t](https://doi.org/10.1021/ic800251t)
8. Ryabov AD, Soukharev VS, Alexandrova L, Le Lagadec R, Pfeffer M (2003) Inorg Chem 42:6598–6600. doi:[10.1021/ic0346578](https://doi.org/10.1021/ic0346578)
9. Weibel MK, Bright HJ (1971) J Biol Chem 246:2734–2744
10. Fetzer L, Boff B, Ali M, Meng X, Collin JP, Sirlin C, Gaiddon C, Pfeffer M (2011) Dalton Trans 40:8869–8878. doi:[10.1039/C0DT01283A](https://doi.org/10.1039/C0DT01283A)
11. Meng X, Leyva ML, Jenny M, Gross I, Benosman S, Fricker B, Harlepp S, Hebraud P, Boos A, Wlosik P, Bischoff P, Sirlin C, Pfeffer M, Loeffler J-P, Gaiddon CA (2009) Cancer Res 69:5458–5466. doi:[10.1158/0008-5472.CAN-08-4408](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4408)
12. Vidimar V, Meng X, Klajner M, Licon C, Fetzer L, Harlepp S, Hebraud P, Sidhoum M, Sirlin C, Loeffler J-P, Mellitzer G, Sava G, Pfeffer M, Gaiddon C (2012) Biochem Pharmacol 84:1428–1436. doi:[10.1016/j.bcp.2012.08.022](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.08.022)
13. Fersht A (ed) (1999) Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. Freeman, New York
14. Le Lagadec R, Alexandrova L, Estevez H, Pfeffer M, Laurinavičius V, Razumiene J, Ryabov AD (2006) Eur J Inorg Chem 2735–2738. doi:[10.1002/ejic.200600375](https://doi.org/10.1002/ejic.200600375)
15. Mete E, Uner D, Çakmak M, Gulseren O, Ellialtıoğlu Ş (2007) J Phys Chem C 111:7539–7547. doi:[10.1002/9780470166383.ch5](https://doi.org/10.1002/9780470166383.ch5)
16. Ivanova EV, Kurnikov IV, Fischer A, Alexandrova L, Ryabov AD (2006) J Mol Catal B Enzym 41:110–116. doi:[10.1016/j.molcatb.2006.05.008](https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.05.008)
17. Schatzschneider U, Niesel J, Ott I, Gust R, Alborzinia H, Wölfl S (2008) Chem Med Chem 3:1104–1109. doi:[10.1002/cmdc.200800039](https://doi.org/10.1002/cmdc.200800039)
18. Zava O, Zakeeruddin SM, Danelon C, Vogel H, Grätzel H, Dyson PJ (2009) ChemBioChem 10:1796–1800. doi:[10.1002/cbic.200900013](https://doi.org/10.1002/cbic.200900013)
19. Kohn MC, Melnick RL (2002) J Mol Endocrinol 29:113–123. doi:[10.1677/jme.0.0290113](https://doi.org/10.1677/jme.0.0290113)
20. Do RP, Stahlhut RW, Ponzi D, Vom SFS, Taylor JA (2012) Reprod Toxicol 34:614–621. doi:[10.1016/j.reprotox.2012.09.006](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.09.006)
21. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr, Lee D-H, Shioda T, Soto AM, Vom SFS, Welshons WV, Zoeller RT, Myers JP (2012) Endocr Rev 33:378–455. doi:[10.1210/er.2011-1050](https://doi.org/10.1210/er.2011-1050)
22. Zhu X-W, Liu SS, Qin LT, Chen F, Liu HL (2013) Ecotoxicol Environ Saf 89:130–136. doi:[10.1016/j.ecoenv.2012.11.022](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.022)
23. Fong G-H, Takeda K (2008) Cell Death Differ 15:635–641. doi:[10.1038/cdd.2008.10](https://doi.org/10.1038/cdd.2008.10)
24. Pappalardi MB, Martin JD, Jiang Y, Burns MC, Zhao H, Ho T, Sweitzer S, Lor L, Schwartz B, Duffy K, Gontarek R, Tummino PJ, Copeland RA, Luo L (2008) Biochemistry 47:11165–11167. doi:[10.1021/bi801624f](https://doi.org/10.1021/bi801624f)
25. Gonzalez MO, Lopez S, Le Lagadec R, Alexandrova L (2011) J Polym Sci Part A Polym Chem 49:4562–4577. doi:[10.1002/pola.24899](https://doi.org/10.1002/pola.24899)
26. Swoboda BEP, Massey V (1965) J Biol Chem 240:2209–2215
27. Jemmali M, Rodriguez-Cabana R (1970) Anal Biochem 37:253–258. doi:[10.1016/0003-2697\(70\)90045-x](https://doi.org/10.1016/0003-2697(70)90045-x)



Journal of Coordination Chemistry

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/gcoo20>

In search for chelating TAMLs (tetraamido macrocyclic ligands) with peripheral bidentate donor centers: a cobalt(III) complex of the 3,3'-(2,2'-bipyridindiyl)-tailed TAML

Rafael Omar Saavedra Díaz^a, Ronan Le Lagadec^a, Longzhu Q. Shen^b & Alexander D. Ryabov^b

^a Instituto de Química, UNAM, México D.F., Mexico

^b Department of Chemistry, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA, USA

Accepted author version posted online: 10 Sep 2014. Published online: 03 Oct 2014.



[Click for updates](#)

To cite this article: Rafael Omar Saavedra Díaz, Ronan Le Lagadec, Longzhu Q. Shen & Alexander D. Ryabov (2014) In search for chelating TAMLs (tetraamido macrocyclic ligands) with peripheral bidentate donor centers: a cobalt(III) complex of the 3,3'-(2,2'-bipyridindiyl)-tailed TAML, Journal of Coordination Chemistry, 67:23-24, 3909-3919, DOI: [10.1080/00958972.2014.964224](https://doi.org/10.1080/00958972.2014.964224)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/00958972.2014.964224>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing,

systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

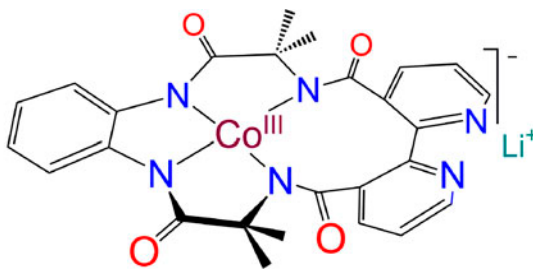
In search for chelating TAMLs (*tetraamido macrocyclic ligands*) with peripheral bidentate donor centers: a cobalt(III) complex of the 3,3'-(2,2'-bipyridindiyl)-tailed TAML

RAFAEL OMAR SAAVEDRA DÍAZ[†], RONAN LE LAGADEC^{*‡},
LONGZHU Q. SHEN[‡] and ALEXANDER D. RYABOV[‡]

[†]Instituto de Química, UNAM, México D.F., Mexico

[‡]Department of Chemistry, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA, USA

(Received 10 June 2014; accepted 26 August 2014)



The synthesis of 1,2-C₆H₄(NHCOCMe₂NHCO)₂-3,3'-(2,2'-bpy) (**3**), a TAML (*tetraamido macrocyclic ligand*) incorporating the peripheral 2,2'-bipyridine unit, is described. Its geometry after optimization by density functional theory (DFT) indicated a rather unfavorable conformation of four N–H amide units for forming macrocyclic transition metal complexes. This explains why the iron(III) derivative of **3** could not be obtained even after deprotonation of the N–H bonds by *n*-BuLi. Nevertheless, the macrocyclic complex of Co^{III} was synthesized in moderate yield, characterized, and explored by DFT. Our data suggest a strongly distorted square-planar geometry of the macrocyclic complex between Co^{III} and **3**. The dihedral angle between the pyridine rings equals 80° ruling out the possibility of metal chelation by the bipyridine unit.

Keywords: Macrocyclic complex; TAML; DFT calculations; Cobalt complex

1. Introduction

The chemistry of metal complexes of TAMLs (*tetraamido macrocyclic ligands*) is a rapidly developing area of modern applied and academic research [1–5]. Attention to these compounds and particularly to the iron derivatives is inspired by their exceptional reactivity

*Corresponding author. Email: ronan@unam.mx.

Dedicated to Prof. Juan Costamagna, a long-time Editorial Board member who is retiring in December 2014.

in peroxidase-like oxidations by hydrogen peroxide, together with their prominent operational stability and resistance to self-destruction during the catalysis [6, 7]. In particular, iron TAMLs catalyze the oxidative bleaching of various dyes, destruction of polychlorinated phenols and nitroaromatics, purification of drinking water by, *inter alia*, efficient decontamination of drugs, and endocrine disruptors. The catalysts convert different molecules into small non-toxic fragments, which is their greatest advantage. Deep fragmentation was shown for polychlorophenols, the fenitrothion pesticide, Orange II, and pinacyanol chloride dyes [3–5]. Fields of application are truly vast and this inspires research to synthesize TAMLs with new structural elements [8–10] for solving specific academic and technological goals.

Using immobilized TAML catalysts on solid supports is an attractive technological application. However, unlike cobalt(II) porphyrin or phthalocyanine macrocycles, which have extensively been studied by Costamagna and co-workers and were shown to be easily attachable to electrode surfaces [11–13], studies on the immobilization of TAML derivatives are limited [14, 15]. There are numerous routines for the preparation of heterogeneous catalysts, including coordinative immobilization [16]. To achieve this, TAMLs should contain peripheral coordinative centers (sites). Additional advantage of this approach is that it allows coordination of other metal units to the peripheral sites and by such to tune electronic and steric features of the catalysts. The first step in this direction was made in the late 1990s when the “head” aryl group of the prototype TAML **1** was replaced by the pyridine functionality (figure 1) [17]. TAML **2** is potentially a peripheral bidentate ligand due to the pyridine nitrogen and the adjacent amide oxygen. Needless to say the oxygen is a poor donor center and therefore alternative options for introducing stronger donor centers should be explored. For this reason, it was decided to design TAML containing a peripheral 2,2'-bipyridine unit such as **3** which could be advantageous when compared to **2**.

In this work, a complexation between cobalt(III) and ligand **3** was investigated. “Trivalent Co is one of the most thoroughly investigated ions in transition metal chemistry ... Six-coordinate octahedral geometry is particularly dominant in this oxidation state ... Despite a century of exploration cobalt(III) chemistry continues to reward and surprise the investigator.” These words have opened the chapter “Cobalt” by Bernhardt and Lawrence in Volume 6 of *Comprehensive Coordination Chemistry II* [18]. Square-planar configurations of Co^{III} are significantly less common than octahedral [18] and therefore the synthesis of **4** is a valid contribution to this field. Square-planar 14-electron Co^{III} complexes are electron deficient species. Their axial sites are opened for various molecules and therefore the complexes are involved in different catalytic processes such as asymmetric epoxidations by iodosylbenzene [19] and air [20] or hydrogenation of alkenes [21]. They are viewed as mimics of the metal core of the cobalt containing nitrile hydratase enzymes [22–25]. In fact,

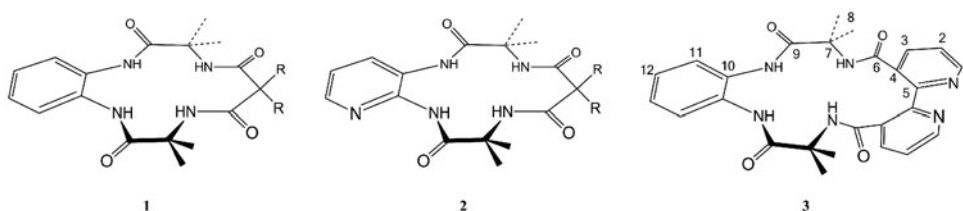


Figure 1. Structure of previously prepared TAMLs and of new ligand **3**.

nitrile hydratase from *Pseudonocardia thermophila* JCM 3095 contains Co^{III} stabilized by two amide nitrogens [26]. Moreover, Co^{III} complex of **1** was recently shown to catalyze cycloaddition of CO₂ to epoxides [27]. Therefore in this contribution we describe the synthesis of TAML **3**, its complexation with cobalt(III), characterization of the products formed, and investigation of the new molecules by density functional theory (DFT) methods.

2. Experimental

2.1. Materials and methods

The ¹H (300.53 MHz) and ¹³C{¹H} (75.56 MHz) NMR spectra were recorded on a JEOL GX300 spectrometer in DMSO-d₆ or CD₃OD. Chemical shifts (δ) and coupling constants (*J*) are expressed in ppm and Hz, respectively. Two-dimensional shift-correlated experiments (COSY, HETCOR) were used to unambiguously assign the chemical shifts. Elemental analyses were carried out in an Elementar Vario Micro Cube. EPR measurements were made with a Jeol JES-TE300 spectrometer. IR spectra were recorded on a Bruker-Alpha ATR apparatus. UV-vis spectra in methanol were obtained using a Shimadzu 2700 spectrophotometer. Electrospray ionization mass spectra (ESI-MS) were obtained using a Bruker Esquire spectrometer. Electrochemical measurements were performed on a PC-interfaced potentiostat-galvanostat AUTOLAB PGSTAT 12.

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and used without purification. All preparative procedures were carried out under dry nitrogen or argon using standard Schlenk techniques. The solvents were distilled from appropriate drying agents under nitrogen. 2-Methyl-2-phthalimidopropanoyl chloride **A** [28], *N,N'*-(1,2-phenylene)bis(2-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)-2-methylpropanamide) **B** [29], *N,N'*-(1,2-phenylene)bis(-amino-2-methylpropanamide) **C** [29], and 3,3'-dicarboxybipyridine acid [30, 31] were prepared as previously described. The [Co(CH₃CN)₆](BF₄)₂ precursor was synthesized according to the literature procedure [32].

2.2. Synthesis of [2,2'-Bipyridine]-3,3'-dicarbonyl dichloride hydrochloride (**D**)

A solution of 1.0 g (4.1 mM) of 3,3'-dicarboxybipyridine acid in 4 mL of thionyl chloride was stirred under argon at room temperature for 12 h. Thionyl chloride was removed under reduced pressure and 5 mL of diethyl ether was added to the flask. The precipitate was filtered off and washed three times with diethyl ether to eliminate residues of SOCl₂. The white solid was dried under vacuum. Yield: 94% (1.36 g). ¹H NMR (DMSO-d₆) 8.85 (dd, 2 H, ²*J* = 5.0, ³*J* = 1.5, **H1**), 8.54 (dd, 2 H, ²*J* = 7.9, ³*J* = 1.5, **H3**), 7.78 (dd, 2 H, ²*J* = 7.9, ²*J* = 5.0, **H2**). FT-IR (cm⁻¹) 2454 (NH), 1711 (CO).

2.3. Synthesis of TAML **3**

A mixture of 1.0 g (3.6 mM) of **C**, 1.27 g (3.6 mM) of **D**, and 2.0 mL (14.4 mM) of Et₃N in 20 mL of dry THF was stirred at 50 °C for 72 h. The mixture was cooled to room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The white residue was

suspended in 10 mL acetone and filtered off. The product was first washed with 10 mL of 2-propanol, then the remaining solid was stirred in 5 mL of 9 : 2 acetone : water mixture to assure complete elimination of $[\text{Et}_3\text{NH}]\text{Cl}$. The white powder was finally washed several times with diethyl ether and dried at 80 °C for 5 h under vacuum. Yield: 65% (1.13 g). ^1H NMR (CD_3OD) 8.55 (d, 2 H, $^2J = 4.8$, **H1**), 8.21 (d, 2 H, $^2J = 7.8$, **H3**), 7.52 (dd, 2 H, $^2J = 6.1$, $^2J = 3.5$, **H11**), 7.45 (dd, 2 H, $^2J = 7.8$, $^2J = 4.9$, **H2**), 7.30 (dd, 2 H, $^2J = 6.1$, $^2J = 3.5$, **H12**), 1.64 (s, 12 H, **H8**). ^{13}C NMR (CD_3OD) 172.01 (CO, **C9**), 171.18 (CO, **C6**), 157.60 (**C5**), 148.45 (**C1**), 137.54 (**C3**), 132.38 (**C10**), 130.42 (**C4**), 126.33 (**C12**), 125.76 (**C11**), 122.70 (**C2**), 56.77(**C7**), 23.81 (**C8**). IR (cm^{-1}): 3253 (NH), 1659 (CO), 1593 (CO). UV-vis (MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 242$ nm, $\varepsilon = 13,500$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. ESI-MS (positive mode): m/z 558 $[\text{M} + \text{THF}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_4 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (%): C, 58.75; H, 5.88; N, 15.81. Found (%): C, 59.03; H, 5.53; N, 15.71.

2.4. Preparation of 4

Ligand **3** (50 mg, 0.1 mM) was dissolved in 10 mL of dry THF at 0 °C and 0.25 mL (0.4 mM) of *n*-BuLi (1.6 M in hexane) was added dropwise. The solution was stirred for 20 min and allowed to reach room temperature. The reaction mixture was cooled to 0 °C, $[\text{Co}(\text{CH}_3\text{CN})_6](\text{BF}_4)_2$ (48 mg, 0.1 mM) added, and the mixture was stirred for 18 h at room temperature. A green brownish precipitate was formed. Air was bubbled through the solution for 2 h and the precipitate turned brown. The suspension was filtered through Celite. The precipitate was first washed with THF and acetonitrile before elution with ethanol. The solvent was evaporated and the green-brownish solid was washed with 3 mL of 9 : 1 acetone : water mixture to eliminate remaining lithium salts, washed with diethyl ether, and dried under reduced pressure. Yield: 40% (23 mg). ^1H NMR (CD_3OD) 8.76 (dd, 2 H, $^2J = 5.8$, $^2J = 3.0$, **H11**), 8.47 (d, 2 H, $^2J = 3.6$, **H1**), 8.15 (br d, 2 H, $^2J = 7.5$, **H3**), 7.44 (br, 2 H, **H2**), 6.95 (dd, 2 H, $^2J = 5.8$, $^2J = 3.0$, **H12**), 1.53 (s, 12 H, **H8**). ^{13}C NMR (CD_3OD) 179.98 (CO, **C9**), 173.38 (CO, **C6**), 157.65 (**C5**), 147.21(**C1**), 144.17 (**C10**), 136.65(**C3**), 135.47 (**C4**), 122.45 (**C2**), 122.13 (**C12**), 120.90 (**C11**), 56.91(**C7**), 27.95 (**C8**). IR (cm^{-1}): 1595 (CO), 1575 (CO). UV-vis (MeOH), $\lambda_{\text{max}} = 260$ and 295 nm, $\varepsilon = 12,800$ and 6100 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, respectively. ESI-MS (negative mode): m/z 541 $[\text{M}]^-$. Anal. Calcd for $\text{C}_{26}\text{CoH}_{22}\text{LiN}_6\text{O}_4 \cdot 4.5\text{H}_2\text{O}$ (%): C, 49.61; H, 4.96; N, 13.35. Found (%): C, 49.78; H, 4.91; N, 13.05.

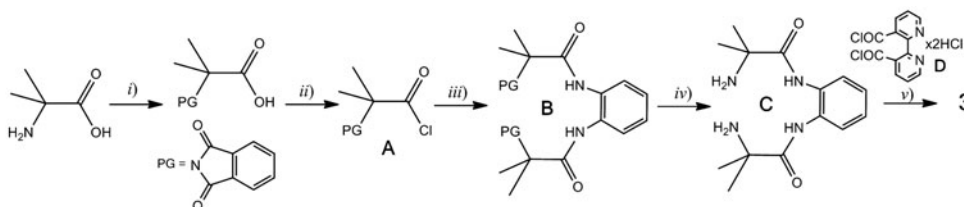
2.5. Computational details

The DFT calculations were performed with Gaussian 09 rev.B.01 [33] using Becke's three parameter hybrid functional [34, 35] along with the Lee–Yang–Parr correlation functional [36] and basis set 6-311G. This approach appeared to be very reliable for DFT studies of TAML complexes [37]. The geometries for **4** were obtained by full optimization in the gas phase until the default convergence criteria were met. The multiplicity of **4** was set to 1 in accordance with the ESR evidence. The initial model of **4** was built using the previously reported X-ray structural data for the Co^{III} complex of TAML **1** [27]. Multiple conformers were computed and the one with the lowest energy was reported. Calculations for ligand **3** were done both in the gas phase and THF solution by invoking the implicit continuum solvent model [38].

3. Results and discussion

3.1. Synthesis and DFT analysis of TAML ligand **3**

TAML ligand **3** was prepared in five steps as shown in scheme 1. The synthesis was based on the methodology previously developed by Collins and co-workers [39], and **3** was characterized by ^1H and ^{13}C NMR, ESI-MS, IR, and UV-vis spectroscopies, and elemental analysis. Analytical data showed that despite prolonged drying under vacuum, water molecules remained attached to the compound. A peak corresponding to water at δ 1.74 is also present in the ^1H NMR spectrum. Characteristic carbonyl stretching frequencies can be observed at 1659 and 1593 cm^{-1} together with the N–H stretching at 3253 cm^{-1} in the IR spectrum of **3**. The ^1H NMR spectra of **3** obtained in DMSO- d_6 or methanol- d_4 contained a single peak at δ 1.64 from all four methyl groups of **3**. This strongly suggests fluxional behavior of the ligand in solution because the DFT-optimized structure of **3**, shown in figure 2 (*vide infra*), indicates clearly the non-equivalence of the methyl groups. There are just five groups of resonances from the aromatic hydrogens and this is also consistent with rapid transitions between possible conformers. No amide resonances were observed which is, however, not unusual for this type of compound in polar water-containing solvents. It is very likely that pyridine nitrogens of **3** favor the hydrogen exchange processes.



Scheme 1. Synthesis of **3**: i) NH_2 group protection, ii) acyl chloride formation, iii) double amidation, iv) deprotection, and v) ring-closure.

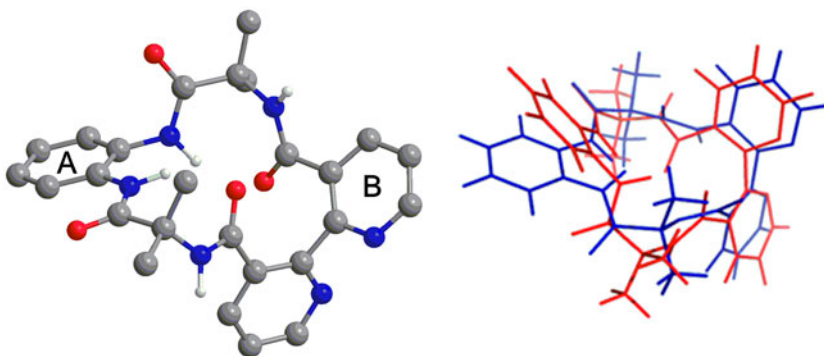


Figure 2. Left: DFT-optimized structure of **3** in the gas phase with only amide hydrogens shown for clarity (C in gray, N in blue, O in red, H in white). Right: overlay of the structures of **3** optimized in the gas phase (red) and in THF (blue) (see <http://dx.doi.org/10.1080/00958972.2014.964224> for color version).

The optimization of the structure of **3** using DFT (figure 2) indicated that metalation of this TAML by a transition metal may not be easy. The ligand is highly distorted and just two of the four amide hydrogens are reasonably directed inside a potential ligand cavity. These are the hydrogens adjacent to the “head” aromatic ring of the ligand. The other two, which are closer to the “tail” part, are significantly diverted from the imaginary center of coordination. The dihedral angle of 80° between the two pyridine rings is also worth mentioning. This ligand feature might be a limiting factor for simple chelation of transition metals by the bipyridine unit of **3**.

The structures of **3** optimized in the gas phase and in THF solution are rather similar (figure 2, right). Both structures are strongly distorted. The amide hydrogens are directed divergently and the two pyridine rings of the bipyridine unit are almost orthogonal (70° and 80° for the gas phase and the THF solution, respectively). The gas phase structure is more globular. The angles between planes of rings A and B equal 95° and 102° in the gas phase and THF, respectively. Overall, the structural features of **3** in solid and solution are quite comparable.

3.2. Synthesis and properties of cobalt(III) TAML complex **4**, a derivative of **3**

TAML **3** does not react with $[\text{Co}(\text{NCMe})_6](\text{BF}_4)_2$ in THF, suggesting that (i) the dihedral angle of 90° as in THF is an obstacle for the binding of Co^{II} to the bipyridine unit and (ii) Co^{II} is unable to metalate amide N–H bonds of **3**. The metalation was, however, realized in the presence of *n*-butyllithium as a strong base, which is known to lithiate TAMLs readily [1]. When the ligand was deprotonated by four equivalents of *n*-BuLi followed by addition of $[\text{Co}(\text{NCMe})_6](\text{BF}_4)_2$, a highly unstable green solid precipitated, presumably a cobalt(II) complex, which after exposure to the air converted to a brown material, which was isolated in moderate yield (40%) and characterized by spectral and analytical data, which allowed assignment of the structure **4** (figure 3) to the newly prepared compound.

Different cobalt salts including CoCl_2 , CoCl_3 , and $\text{Co}(\text{acac})_3$ were also used for the synthesis of **4**. In all cases, **4** was obtained in low yields (~20–30%) and the formation of salts as by-products complicated the purification. The cleanest reaction and the highest yield were achieved when $[\text{Co}(\text{NCMe})_6](\text{BF}_4)_2$ was employed. The incorporation of cobalt has been confirmed by ESI-MS data. There are no N–H stretching bands in the IR spectrum of

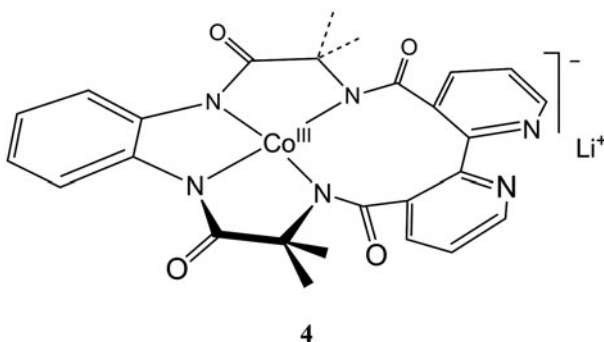


Figure 3. Proposed structure for cobalt(III) complex **4**.

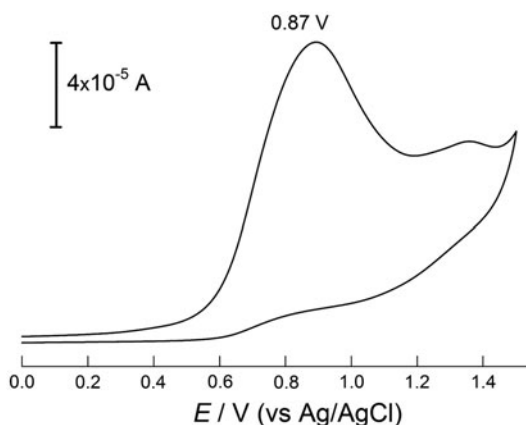


Figure 4. Cyclic voltammogram of **4** (1 mM) obtained in methanol in the presence of 0.1 M (*n*-Bu)₄NPF₆. Scan rate 100 mV s⁻¹, glassy carbon working electrode, and auxiliary Pt electrode.

4 and the carbonyl bands are now observed at 1595 and 1575 cm⁻¹, lower frequencies than in the free ligand **3**. The compound is EPR silent both at 77 K and room temperature, suggesting that **4** is a cobalt(III) derivative with *S* = 0. Diamagnetic features of **4** are consistent with ¹H and ¹³C NMR data collected in methanol-d₄, though this was a challenge, because **4** is only slightly soluble in alcohols and is almost insoluble in other common organic solvents. This complicated the purification and made it impossible to grow crystals of **4** for X-ray investigation due to a strong tendency of **4** to precipitate from all solutions tested. Nevertheless, NMR spectra were obtained to reveal, similar to the ligand **3** case, just one set of signals. A plane of symmetry is very unlikely for **4** and therefore the complex should be extremely fluxional in solution at ambient conditions. There is one singlet resonance from all four methyl groups at δ 1.53 (*versus* at δ 1.64 for **3**). The resonances from aromatic hydrogens 11 and 12 (see figure 1 for the numbering scheme), which are the closest to cobalt(III), are also shifted to lower field for H11 ($\Delta\delta$ 1.24) and to higher field for H12 ($\Delta\delta$ 0.35), whereas the chemical shifts for the remaining aromatic protons remained practically unchanged. These observations are also consistent with the location of Co^{III} inside the macrocycle.

Redox properties of **4** studied by cyclic voltammetry and presented in figure 4 did not prove to be promising. There is an irreversible oxidative feature seen around 0.87 V *versus* Ag/AgCl. This value lies in the range typical of Co^{III} TAMLs and corresponds to the Co^{III} → Co^{IV} transition [40, 41]. This process is reversible in TAML complexes which are much less distorted than **4** [40, 41].

Attempts to synthesize the corresponding iron(III) complex, analogous to various iron TAML derivatives possessing high catalytic activity in peroxidase-like reactions [3–5], were, however, unsuccessful. Using iron(II) precursors such as FeCl₂ and [Fe(NCMe)₆](BF₄)₂ the formation of a green precipitate was observed which then transformed into a red compound on exposure to air. The same red solid was obtained starting from iron(III) salts FeCl₃ and Fe(acac)₃. However, the red compound decomposed always upon purification as a result of demetalation. This is probably because iron(III) complexes are usually less robust than their cobalt counterparts and are more prone to hydrolysis and

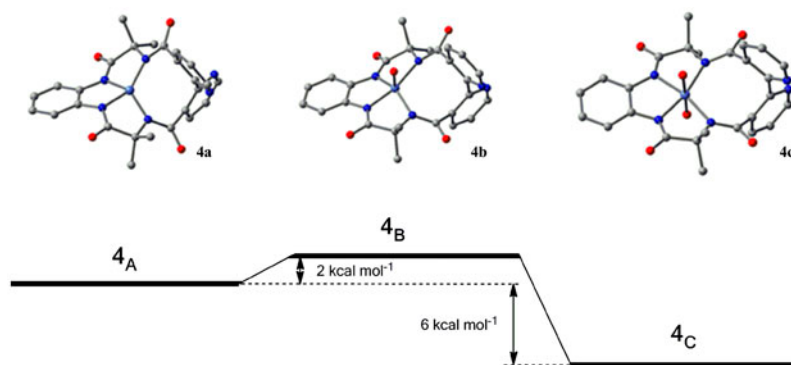


Figure 5. DFT-optimized structures of **4** assuming three coordinative modes of Co^{III} : square-planar (**4_A**), tetragonal pyramid (**4_B**), and octahedron (**4_C**). Donor centers of the “plane” are four deprotonated amide nitrogens; fifth and sixth sites are oxygens of aqueous ligands. Hydrogens are not shown for clarity. Below are the relative energies of **4_A**, **4_B**, and **4_C**.

reaction with oxygen [27]. It is also known that a distortion of the planar arrangement of deprotonated amide nitrogens around iron(III) make such TAML complexes very unstable to moisture [42].

3.3. DFT optimizations of coordinative polyhedra of **4**

According to X-ray structural data of previously reported cobalt(III) TAML complexes, cobalt(III) surrounded by four deprotonated amide nitrogens of TAMLs adopts a square-planar geometry with distortion [27, 40, 41, 43]. Our spectroscopic data agree with such a structural model though it is natural to anticipate significantly larger distortions of the square plane in the case of TAML **3**. In the absence of crystallographic information, it was intriguing to predict theoretically the coordinative polyhedron of Co^{III} in **4**. Therefore, several DFT simulations of coordinative variants of **4** have been performed. Main results are shown in figure 5. Square plane of **4_A** is extremely distorted. The Co–N bond distances vary significantly from 1.85 to 1.91 Å, the longest bond being closer to the bipyridine unit. Amide nitrogens in octahedral (or square bipyramidal) model **4_C** built up by two axial aqueous ligands are significantly more planar than four-coordinate model **4_A** and the Co–N bond distances are 1.91–2.02 Å. Model **4_C** is more, by 6 kcal M^{-1} , energetically favored. Interestingly, the five-coordinate model **4_B** seems to be less advantageous energy-wise than **4_A**. The amide nitrogens of **4_B** are similarly distorted as in **4_A** and the Co–N bond distances are 1.85–2.02 Å, i.e. their variation is the largest for **4_B**. It is worth noting the Co–N bond distances are practically of the same length and equal to 1.82–1.83 Å in the undistorted Co^{III} complex with TAML **1** [27]. To this end, the stability of computed structures decreases in the series: **4_C** > **4_A** > **4_B**. The series gives some extra confidence with the assignment of cobalt(III) TAML as **4**. TAML complexes of Co^{III} , Ni^{III} , and Co^{IV} are four coordinate in the solid state in the absence of extra strongly coordinating ligands [27, 40, 41, 43]. TAML complexes of Fe^{III} and Fe^{IV} are five coordinate and never six as solids, provided the same condition holds. Thus, since **4_A** is more energetically advantageous than **4_B**, we assume that structural assignment of **4** as **4_A** seems to be the most probable.

Other observations worth mentioning are as follows. The dihedral angle between the pyridine rings is large in all three models, i.e. 97° , 85° , and 79° in **4_A**, **4_B**, and **4_C**, respectively. Thus, it is rather problematic for the bipyridine unit of **4** to serve as a bidentate ligand. In addition to **4_A**, we have found a configuration for **4** with significantly more planar four amide donor nitrogens. However, it is by 6 kcal M^{-1} less stable than structure **4_A** in figure 5. Because of this unfavorable energy difference we believe that configuration **4_A** is more realistic.

4. Discussion

Ligand **3** was prepared in a moderate yield and, despite its highly distorted structure, its macrocyclic coordination with cobalt(III) via four deprotonated amide nitrogens was achieved. Complex **4** is believed to be a strongly distorted square-planar Co^{III} derivative. The distortion accounts for hydrolytic instability of **4** and its ease to demetallate as previously established for iron(III) TAMLs [42]. Our efforts are now concentrating on studying the coordination of other metals such as nickel and copper and evaluating the properties of the resulting compounds.

Attempts to coordinate a second metallic fragment, such as copper or ruthenium, to the peripheral bipyridine moiety were unsuccessful. However, this negative result could be anticipated considering the above-mentioned DFT-optimized structure. The lone pairs of the bipyridine nitrogens are oppositely directed making impossible the bidentate coordination of a metal center.

Addition and/or rapid exchange of aqueous ligands is relevant to catalytic reactivity. Therefore, DFT analysis of structural changes of **4** induced by axial ligation of aqueous ligands is of particular interest. It is clearly seen in figure 5 that consecutive ligation by two H_2O molecules introduces “non-linear” structural variations. Though addition of one water molecule to **4_A** to form **4_B** destabilizes the complex, two water molecules bring about the energetic stabilization of **4_C**, and “in-plane” optimization of the amide nitrogens. Geometry close to ideal was predicted in terms of a near orthogonal distribution of $\text{Co-N}_{\text{amide}}$ and $\text{Co-O}_{\text{water}}$ bonds as shown for **4_C** in figure 5. The axial Co-OH_2 distance of ca. $1.95 \text{ \AA}$ for both water molecules is quite reasonable for the axial H_2O bond with cobalt. The existence of **4_C** with an energy minimum suggests that **4_C** might be a dominating species in aqueous solution similar to iron(III) TAMLs, which are square pyramidal as solids but exist as octahedral diaqua species in water [42].

5. Conclusion

The cobalt(III) complex with a new TAML incorporating the peripheral 2,2'-bipyridine unit is described. Though the ligand geometry is rather unfavorable for the formation of macrocyclic complex, the Co^{III} containing compound obtained after deprotonation of the N-H bonds by *n*-BuLi is stable and slightly soluble in alcohols. Similar iron(III) complex could not be obtained. The macrocyclic complex of Co^{III} was explored by DFT and a strongly distorted square-planar geometry is suggested.

Acknowledgements

Financial support from DGAPA-UNAM (PAPIIT Project IN204812) and CONACyT (Project 153151 and scholarship 216383 to ROSD) is acknowledged. We thank Dr Terrence J. Collins for allowing ROSD to perform some experiments in CMU and his interest to this project.

References

- [1] T.J. Collins. *Acc. Chem. Res.*, **27**, 279 (1994).
- [2] T.J. Collins. *Acc. Chem. Res.*, **35**, 782 (2002).
- [3] T.J. Collins, S.K. Khetan, A.D. Ryabov. In *Handbook of Green Chemistry*, P.T. Anastas, R.H. Crabtree (Eds), pp. 39–77, Wiley-VCH Verlag GmbH & KgaA, Weinheim (2009).
- [4] A.D. Ryabov, T.J. Collins. *Adv. Inorg. Chem.*, **61**, 471 (2009).
- [5] A.D. Ryabov. *Adv. Inorg. Chem.*, **65**, 118 (2013).
- [6] A. Chanda, A.D. Ryabov, S. Mondal, L. Alexandrova, A. Ghosh, Y. Hangun-Balkir, C.P. Horwitz, T.J. Collins. *Chem. Eur. J.*, **12**, 9336 (2006).
- [7] M. Emelianenko, D. Torrejon, M.A. DeNardo, A.D. Ryabov, T.J. Collins. *J. Math. Chem.*, **52**, 1460 (2014).
- [8] W.C. Ellis, C.T. Tran, M.A. Denardo, A. Fischer, A.D. Ryabov, T.J. Collins. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 18052 (2009).
- [9] W.C. Ellis, C.T. Tran, R. Roy, M. Rusten, A. Fischer, A.D. Ryabov, B. Blumberg, T.J. Collins. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 9774 (2010).
- [10] C. Panda, M. Ghosh, T. Panda, R. Banerjee, S. Sen Gupta. *Chem. Commun.*, **47**, 8016 (2011).
- [11] C. Barrera, I. Zhukov, E. Villagra, F. Bedioui, M.A. Páez, J. Costamagna, J.H. Zagal. *J. Electroanal. Chem.*, **589**, 212 (2006).
- [12] G. Ramírez, M. Lucero, A. Riquelme, M. Villagrán, J. Costamagna, E. Trollund, M.J. Aguirre. *J. Coord. Chem.*, **57**, 249 (2004).
- [13] E. Villagra, F. Bedioui, T. Nyokong, J.C. Canales, M. Sancy, M.A. Páez, J. Costamagna, J.H. Zagal. *Electrochim. Acta*, **53**, 4883 (2004).
- [14] A.D. Ryabov, R. Cerón-Camacho, O. Saavedra-Díaz, M. Denardo, A. Ghosh, R. Le Lagadeç, T. Collins. *Anal. Chem.*, **84**, 9096 (2012).
- [15] E.L. Demeter, S.L. Hilburg, N.R. Washburn, T.J. Collins, J.R. Kitchin. *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 5603 (2014).
- [16] J.M.S. Cabral, J.F. Kennedy. *Bioprocess Technol.*, **14**, 73 (1991).
- [17] C.G. Miller, S.W. Gordon-Wylie, C.P. Horwitz, S.A. Strazisar, D.K. Peraino, G.R. Clark, S.T. Weintraub, T.J. Collins. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 11540 (2004).
- [18] P.V. Bernhardt, G.A. Lawrence. In *Comprehensive Coordination Chemistry II*, J.A. McCleverty, T.J. Meyer (Eds), Vol. 6, pp. 1–145, Elsevier, Oxford (2004).
- [19] S. Ozaki, H. Mimura, N. Yasuhara, M. Masui, Y. Yamagata, K. Tomita, T.J. Collins. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 353 (1990).
- [20] J. Estrada, I. Fernández, J.R. Pedro, X. Ottenwaelde, R. Ruiz, Y. Journaux. *Tetrahedron Lett.*, **38**, 2377 (1997).
- [21] Q. Knijnenburg, A.D. Horton, H. Heijden, T.M. Kooistra, D.G.H. Hetterscheid, J.M.M. Smits, B. Bruin, P.H.M. Budzelaar, A.W. Gal. *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **232**, 151 (2005).
- [22] T.C. Harrop, P.K. Mascharak. *Acc. Chem. Res.*, **37**, 253 (2004).
- [23] J.A. Kovacs. *Chem. Rev.*, **104**, 825 (2004).
- [24] P.K. Mascharak. *Coord. Chem. Rev.*, **225**, 201 (2002).
- [25] T. Yano, T. Ozawa, H. Masuda. *Chem. Lett.*, **37**, 672 (2008).
- [26] A. Miyanaga, S. Fushinobu, K. Ito, T. Wakagi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **288**, 1169 (2001).
- [27] A. Ghosh, P. Ramidi, S. Pulla, S.Z. Sullivan, S.L. Collom, Y. Gartia, P. Munshi, A.S. Biris, B.C. Noll, B.C. Berry. *Catal. Lett.*, **137**, 1 (2010).
- [28] S. Al-Hassan, R.J. Cameron, A.W. Curran, W.J.S. Lyall, S.H. Nicholson, D.R. Robinson, A. Stuart, C.J. Suckling, I. Stirling, H.C.S. Wood. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1645 (1985).
- [29] C.P. Horwitz, A. Ghosh. US Patent 7060818 (2006).
- [30] B.Z. Shan, Q. Zhao, N. Goswami, D.M. Eichhorn, D.P. Rillema. *Coord. Chem. Rev.*, **211**, 117 (2011).
- [31] G.F. Smith, F.P. Richter. *Phenanthroline and Substituted Phenanthroline Indicators*, p. 20, The G.F. Smith Chemical, Columbus, GA (1944).
- [32] B.J. Hathaway, A.E. Underhill. *J. Chem. Soc.*, 3705 (1960).
- [33] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov,

- J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox. *Gaussian 09, Revision B.01*, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA (2009).
- [34] A.D. Becke. *J. Chem. Phys.*, **98**, 3 (1993).
- [35] A.D. Becke. *Phys. Rev. A*, **38**, 3098 (1988).
- [36] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr. *Phys. Rev. B*, **37**, 785 (1988).
- [37] A. Chanda, X. Shan, M. Chakrabarti, W.C. Ellis, D.L. Popescu, F. Tiago de Oliveira, D. Wang, L. Que Jr, T.J. Collins, E. Münck, E.L. Bominaar. *Inorg. Chem.*, **47**, 3669 (2008).
- [38] A.V. Marenich, C.J. Cramer, D.G. Truhlar. *J. Phys. Chem. B*, **113**, 6378 (2009).
- [39] D.L. Popescu, A. Chanda, M. Stadler, F. de Oliveira, A.D. Ryabov, E. Münck, E.L. Bominaar, T.J. Collins. *Coord. Chem. Rev.*, **252**, 2050 (2008).
- [40] T.J. Collins, R.D. Powell, C. Slebodnick, E.S. Uffelman. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 8419 (1991).
- [41] W.C. Ellis. Green design, synthesis, characterization, and application of a novel family of Fe(III)-TAML peroxide activating homogeneous catalysis. PhD thesis, Department of Chemistry, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA (2010).
- [42] A. Ghosh, A.D. Ryabov, S.M. Mayer, D.C. Horner, D.E. Prasuhn Jr, S. Sen Gupta, L. Vuocolo, C. Culver, M.P. Hendrich, C.E.F. Rickard, R.E. Norman, C.P. Horwitz, T.J. Collins. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 12378 (2003).
- [43] T.J. Collins, E.S. Uffelman. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**, 1509 (1989).