

# DISEÑO DE COMPLEJOS BINUCLEARES DE COBRE EN ESTUDIOS BIOMIMÉTICOS DE LA TIROSINASA

Rolando Calero Mendoza PhD\*

\* Centro de investigación de Ingeniería Industrial, Fac. de Ingeniería Industria.

Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE).

Campus La Libertad, vía principal Santa Elena- Santa Elena

La libertad Ecuador.

e-mail: [rcalero30@hotmail.com](mailto:rcalero30@hotmail.com)

## Resumen

*Se ha estudiado la reactividad de ciertas metaloenzimas de cobre y algunos complejos de Cobre sintéticos que presentan reactividad frente a sustratos, a través de la interacción con el oxígeno molecular, además se ha observado en las varias formas en como ocurre esta interacción y la razón por la cual porque unos actúan con el oxígeno para ser transportadores como las Hemocianinas y otros formando aductos para mediar reacciones químicas hacia ciertos sustratos fenólicos. También se propone una revisión de los mecanismos para la hidroxilación de fenoles y la oxidación a quinonas, encontrando una dependencia atribuible a factores estéricos y redox en la unión catalizador-sustrato.*

**Palabras claves:** complejos de cobre, tirosinasa, oxidación, catálisis, metaloenzimas.

## Abstract

*The reactivity of certain copper metalloenzymes and some synthetic copper complex has been studied, showing reactivity with substrates, through interaction with the molecular oxygen. Also they has been observed the several forms they interact and the reason why some of this act with the oxygen to be carrier as for example Hemocyanins, and others forming adducts to mediate chemical reactions towards certain phenolic substrates. It is also proposed a review of the mechanisms for phenol hydroxylation and oxidation to Quinone. Finding dependence to esteric and redox factors in the bond substrate-Cu complex.*

**Key Words:** dimeric copper complexes, oxidation, catalysis, tirosinase, metalloenzymes.

## 1. Introducción.

Los complejos metal-ligando juegan un papel fundamental en las reacciones mediadas por catalizadores, por lo que la síntesis y caracterización de complejos órgano-metálicos que tratan de emular las funciones enzimáticas ayudan a entender dilucidar y corroborar el comportamiento de las metaloenzimas y el mecanismo de reacción en que participan en obtención de un producto de reacción.

Como ejemplo tenemos a las monooxigenasas que son enzimas que juegan un rol preponderante en la biosíntesis, degradación y transformación de una variedad de compuestos biológicamente activos como aminoácidos, lípidos y azúcares, así como en procesos ambientales de degradación de la materia orgánica del suelo y la fijación de oxígeno atmosférico. Este hecho hace que se encuentren

ampliamente distribuidas en la naturaleza tanto en microorganismos aeróbicos como en células de animales y plantas. En todos los casos se manifiesta su enorme capacidad de mediar reacciones de oxidación a muy altas velocidades, siendo además selectivas en condiciones ambientales hacia sustratos<sup>1</sup>.

Estos sustratos que podrían ser potencialmente peligrosos y contaminantes como los fenoles generados en la industria. La presencia de fenoles, tienen gran importancia dentro de los procesos industriales y el medio ambiente debido a sus múltiples usos y aplicaciones dentro de las industrias como por ejemplo desinfectantes, plaguicidas, antisépticas, edulcorantes, oxidantes, colorantes y detonantes, pero también es conocida su toxicidad es decir por su presencia de ellos como contaminantes tanto por causas naturales como por su aporte debido a actividades humanas que

aumenta el riesgo de dispersión en el medio ambiente<sup>2</sup>. De ahí la importancia de conocer más sobre catalizadores que lleven a cabo la degradación de estas moléculas debido a que el grado de contaminación de los ecosistemas y la reducción o eliminación de su efectocontaminante se tornaría notablemente importante con estos alcances científicos. Los fenoles vertidos al medio ambiente sufren un proceso de dispersión que depende de sus propiedades físico – químicas, por ello resulta vital prestar interés a su origen, migración y distribución en los ecosistemas.

Muchos fenoles presentan gran toxicidad debido a su fácil absorción en animales y el hombre a través de la piel y las membranas mucosas. Su toxicidad afecta directamente a gran variedad de tejidos, órganos, sistemas de órganos e incluso a los cromosomas<sup>2</sup>.

Otro ejemplo de importancia de la acción catalítica de enzimas y catalizadores sintéticos lo tenemos en la síntesis de catecolaminas como la dopamina, noradrenalina y adrenalina, que actúan como mediadores químicos en la transmisión adrenérgica y que son sintetizadas a partir del aminoácido tirosina. Este precursor circula en el torrente sanguíneo el cual es captado por los axones mediante un mecanismo de transporte activo. Sobre la tirosina actúa una enzima que es la tirosinhidroxilasa que es la encargada de transferir grupo OH para convertirla en dioxifenilalanina o DOPA. Esta enzima es estereoespecífica y muestra un alto grado de especificidad por el sustrato el cual representa la etapa limitante en la biosíntesis de la noradrenalina<sup>1,3,4</sup>.

Luego sobre la DOPA actúa una nueva enzima que es la dopa-decarboxilasa para formar dopamina y luego sobre esta actúa otra enzima que es la dopamin beta-hidroxilasa que introduce un grupo OH en el carbono beta de la cadena lateral formando finalmente adrenalina (figura 1).

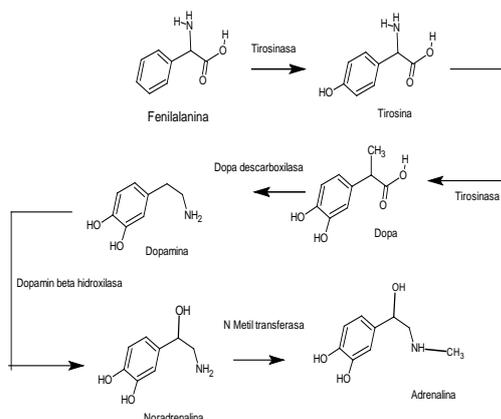


Figura 1 Biosíntesis de catecolaminas

Es así que mientras la tirosinasa cataliza la hidroxilación de la tirosina a DOPA (actividad creolasa) y la oxidación de DOPA a dopaquinona (actividad catecolasa) a través de una transferencia electrónica de O<sub>2</sub> al sustrato, la Catecol-oxidasa cataliza exclusivamente la oxidación de catecoles a quinonas sin actuar sobre la tirosina.

Para la comprensión y estudios de las características y mecanismos por los cuales se hace posible la catálisis oxidativa en metaloenzimas, numerosos investigadores han recurrido a la modelación química mediante el diseño de compuestos de coordinación simples tratando de emular y simplificar las propiedades enzimáticas.

Estos diseños se basarían en propiedades espectroscópicas que ponen en evidencia las probables estructuras de estos compuestos<sup>4</sup>.

Todos estos diseños tienen una aplicación de gran utilidad ya que estos modelos químicos biomiméticos darían pistas hacia el desarrollo de nuevos instrumentos de detección de enfermedades relacionados con la carencia de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina, dopa) cuyos orígenes están relacionados con el déficit de dopamina. Por ejemplo tenemos la enfermedad de Parkinson enfermedad cual cuyo origen es el déficit de DOPA en la transmisión adrenérgica, déficit que a su vez estaría involucrado una disminución de la enzima tirosinasa (figura 2).

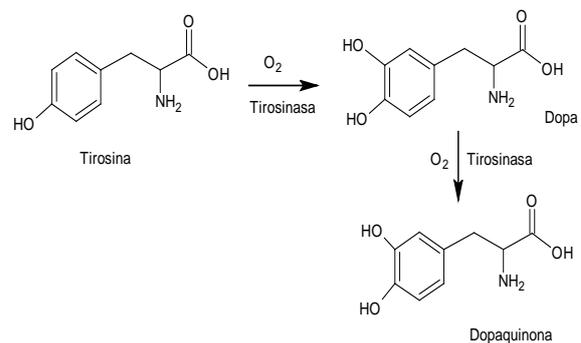


Figura 2 Biosíntesis de la dopamina

## 2. Catálisis por metaloenzima de cobre

Los procesos catalíticos de oxidación mediados por enzimas de cobre son procesos complejos que involucran la participación del oxígeno formando parte de un aducto cobre/oxígeno.

Existen pocos modelos cuyas estructuras se han podido determinar por difracción de rayos X,

donde el Oxígeno molecular  $O_2$  presenta diferentes arreglos con uno o dos centros de cobre<sup>4</sup>(figura 3)

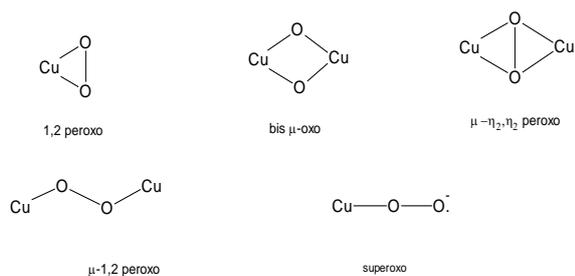


Figura3 Diferentes tipos de aductos de  $Cu/O_2$

Las caracterizaciones del centro  $Cu/O$  presente en estos sistemas modelos ya sea por espectroscopia o por difracción de rayos X, constituyen una fascinante área de la bioinorgánica que además es crucial para el futuro entendimiento de las reacciones de oxigenación mediado por las metaloenzimas de cobre<sup>4</sup>.

Estas enzimas se denominan “Proteína de cobre tipo tres” las cuales están involucradas en una variedad de funciones biológicas como por ejemplo tenemos: la Hemocianina (Hcs) que tiene como función la de servir como transportador de  $O_2$  en moluscos y artrópodos; la Catecoloxidasa (COasa) que oxida ortodifenoles a ortoquinonas(actividad difenolasa) y Tirosinasa que cataliza la hidroxilación de monofenoles a ortodifenoles (actividad monofenolasa ) con la subsiguiente oxidación a ortoquinona<sup>3</sup>.

La obtención de estructuras del sitio activo de estas proteínas por difracción de rayos X con excepción de la tirosinasa muestra que el oxígeno forma un aducto con la enzima en forma de oxipara la hemocianina de la langosta (*Panulirus interruptus*); también se ha presentado la forma oxi y deoxi en hemocianinas de ciertos crustáceos (*Limulus polyphemus*), formas oxien Hemocianinas de ciertos arácnidos y formas deoxi, met y enlace inhibido de la Carboxil-oxidasa en la patata dulce (*Ipomoea batatas*). Figura 4

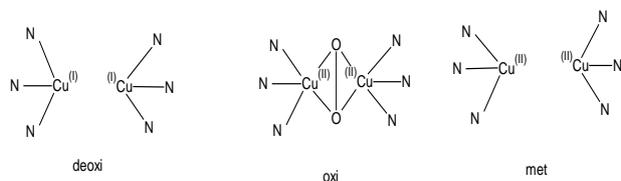


Figura 4 Aductos de  $O_2$  de las proteínas de cobre.

De lo anteriores se tiene interesantes observaciones como por ejemplo que todos los sitios activos contienen virtualmente el mismo centro binuclear de cobre el cual se encuentra en forma deoxi  $Cu(I) - Cu(I)$  en la forma original enlazando reversiblemente al  $O_2$  y conduciendo a la formación de especies  $\mu-\eta^2: \eta^2$  peroxidocobre (II).

La estructura cristalina de la forma nativa de la Hemocianina de la langosta (*Panulirus interruptus*) (15), muestra un dímero de cobre (I) con distancias entre ellos de 3.5 3.6 Å con cada cobre (I) se oxida dando lugar a un peroxo complejo de cobre (II)

Otra hemocianina (*Limulus polyphemus*) que ha sido estudiada presenta casi la misma estructura cristalina en la forma oxigenada, mostrando dos átomos de cobre separados de 3.4 Å de distancia en un complejo de tipo  $\mu-\eta^2: \eta^2$  peroxidocobre(II).

Estudios hechos en la catecol-oxidasa (16) de la patata dulce (*Ipomoea batatas*) (EXAFS) revelaron que cada átomo de cobre presenta un número de coordinación igual a cuatro con una distancia de 2.9 Å para la forma original met cuyo centro activo es  $Cu(II) Cu(II)$  en donde ambos átomos de cobre presentan en la esfera de coordinación: ( $\mu-OH$ ) $Cu(His)_3$ . La secuencia de esta proteína muestra cierta analogía con la estructura primaria de la proteína (hemocianina) con un sitio binuclear de cobre aislado. Además se ha observado recientemente en estudios por rayos X que esta catecol oxidasa muestra que en la forma met solo uno de los Cu del dímero coordina al sustrato fenólico.

La caracterización más detallada del enlace en esta enzima permite conocer más acerca de la coordinación de ortodifenoles. Los estudios estructurales se ha comparados con los estudios de enlace de monofenoles con hemocianinas activadas. Otros estudios de importancia son aquellos que comparan la actividad mono y difenolasa en Hemocianinas de artrópodos. El mecanismo de activación ha sido explicado en base de datos estructurales de hemocianinas de *Limulus polyphemus* en el que el nitrógeno terminal de la fenilalanina (Phe49) es altamente conservado en las hemocianinas y catecoloxidasa; sin embargo en la tirosinasa este residuo es empujado hacia el exterior de la cavidad proteica permitiendo el acceso libre para la entrada del oxígeno y sustratos potenciales, que como en la tirosina ocuparían un espacio dentro de la cavidad de dicho centro activo del cobre; pero que debido a restricciones estéricas e interacciones hidrofóbicas entre el anillo fenil del sustrato y el aminoácido axial histidina (His 328) en el Cu B y un residuo de tirosina (Thr 351) cercano al Cu A, habría impedimentos estéricos y solo una orientación

posible. El resultado de esta coordinación muestra el anillo fenilo casi perpendicular al plano Cu-O<sub>2</sub>-Cu con contactos cercanos de su grupo hidroxilo al Cu<sub>A</sub> y de su posición orto a uno de los átomos de oxígeno del liganteperoxo. Posteriormente la proximidad de la posición orto del anillo aromático al O<sub>2</sub> será esencial para el proceso de hidroxilación. La diferencia entre la actividad de tirosinasa y catecoloxidasa se encontraría entonces en que en este último presenta uno de los centros de Cu protegido por un residuo de fenilalanina, lo cual dificulta el acceso de sustrato fenólicos y por consiguiente restricción para la actividad monofenolasa. Esto demuestra la importancia de factores estéricos en la actividad del centro de cobre.

Teniendo estas evidencias químicas y espectroscópicas se puede inferir que el sitio activo de la Hemocianina y Tirosinasa son virtualmente idénticos, y que la diferencia en su función se encontraría en la accesibilidad que presenta los centros activos para enlazar moléculas de sustratos.

### 3. Estudios en modelos químicos<sup>5,6</sup>.

Los esfuerzos por entender los procesos biológicos de las enzimas de Cobre conocer sus centros activos y como se lleva a cabo los procesos catalíticos de oxigenación e hidroxilación ha hecho que investigadores se interesen en diseñar y sintetizar modelos químicos que puedan servir como modelos funcionales o estructurales para la tirosinasa, catecol-oxidasa o enzimas de Cu relacionadas<sup>6-28</sup>. Uno de los primeros trabajos ha sido el reportado por Nishida<sup>12</sup>, que obtuvo complejos cuadrados planar con pequeñas actividades catalíticas mientras que también obtuvo complejos mononucleares de Cu (II) no planares que mostraban un alto potencial catalítico. Nishida notó que ciertos complejos dinucleares de cobre también podrían catalizar el proceso de oxidación siempre y cuando la distancia entre Cu y Cu es menor a 5 Å. Concluyendo que el factor estérico entre el sustrato y complejos podría ser el factor determinante para la actividad catalítica. También mostró que dos centros metálicos deben localizarse en posición adecuada para facilitar el enlace de dos oxígenos hidroxilos proveniente del catecol previo a la transferencia de electrones. Esta teoría se sustenta en la observación de complejos dinucleares de cobre generalmente son más activos en la oxidación de catecoles que las correspondientes especies mononucleares.

En la mayoría de los complejos sintetizado últimamente también se puede generalizar un factor importante en el diseño de estos complejos y es que la mayoría contienen ligantes con grupos N-dadores de electrones como son:

piridinas, imidazoles o benzilimidazoles que pueden variar de sistemas bidentados a heptadentados con puentes fenoxis o alcoxi o aun sin grupos endógenos para que puedan formar puentes con el oxígeno y posteriormente con el sustrato.

Así tenemos los estudios de T. Moro-oka<sup>12</sup> quien diseñó complejos dinucleares de cobre II con ligantes tri y heptadentados basados en sistemas de metalo enzimas. Estos estudios mostraron que la reactividad de complejos de cobre hacia el catecol puede estar afectada por factores estructurales así como también electrónicos.

Malachowski y colaboradores<sup>14</sup> también estudiaron la actividad catalítica en complejos de cobre (II) utilizando ligantes tetradentados con anillos pirazol y benzilimidazol además de un quinto ligante exógeno variable (figura 5). En sus resultados encontró que los complejos con ligantes derivados del pirazol son mejores catalizadores que aquellos que utilizaban benzilimidazol como ligantes. La explicación se encontraría en el efecto estérico del anillo benzilimidazol que dificulta la interacción entre el sustrato y el centro de Cu. Por otra parte el efecto del quinto ligante estaría relacionado fuertemente con la facilidad de disociación para permitir la entrada del sustrato.

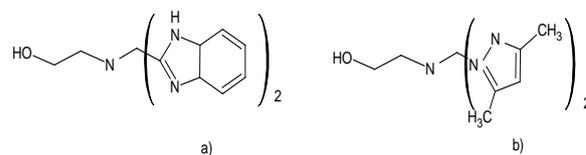


Figura 5 Ligantes tripodales N<sub>3</sub>O tipo a) *N,N*-bis(2-benzimidazol-metil)-1-hidroxi-2-aminoetano y b) *N,N*-bis(3,5-dimetilpirazol-1-metil)-1-hidroxi-2-aminoetano.

Casella y colaboradores<sup>15,16,17</sup> mostraron que el cambio en el diseño del catalizador puede afectar en alguna extensión su reactividad en reacciones de oxidación de sustratos como también así como en los potenciales redox (figura 6).

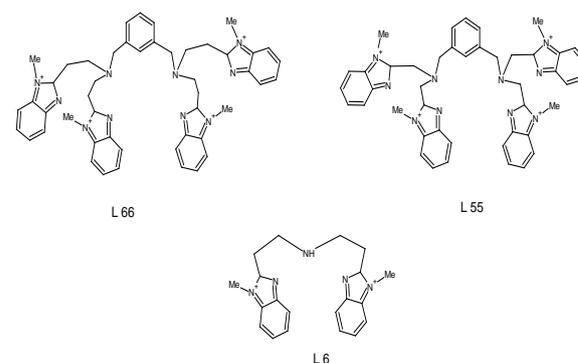


Figura 6 Estructuras de ligantes de Casella

Karlin a su vez<sup>4,9</sup> sintetizó modelos cuya reactividad del catalizador hacia el sustrato se debe a un ataque del anillo areno donde el LUMO del peróxido del centro peroxo/ Cu el cual tiene carácter  $\pi$  es atacado por el HOMO del carbono próximo al carbono hidroxilado del anillo areno; donde por factores geométricos y electrónicos la hidroxilación del anillo xilil en estos sistemas ocurre solo por carácter  $\pi^*$  del Cu/peroxo (figura 8).

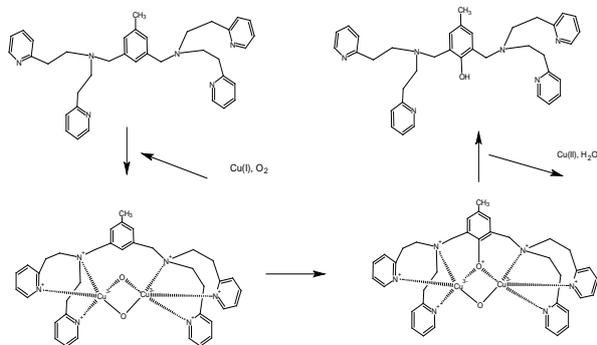


Figura 7. Mecanismo de hidroxilación propuesto por Karlin

Se ha comprobado recientemente a través de espectroscopia Raman que la hidroxilación aromática ocurre vía la formación de un intermediario peroxo  $\mu-\eta^2: \eta^2$  en el que tanto por espectroscopia como por teoría de orbitales moleculares se demostró que la hidroxilación del anillo aromático ocurre por un mecanismo de sustitución electrofílica.

Otros estudios mostraron<sup>11</sup> complejos de cobre /O<sub>2</sub> del tipo  $\mu$ -oxo de Cu (III) los cuales fueron caracterizados estructural y espectroscópicamente. Se ha reportado también que estas especies son capaces de existir en equilibrio o interconvertirse en sus isómeros  $\mu-\eta^2: \eta^2$  dicobre (II) el espectro de absorción obtenido para el bis  $\mu$ -oxo es muy diferente del peroxo con bandas en 324 y 448 nm sugiriendo que las bandas adicionales que aparecen en los 435 nm (modelos de Karlin sería derivado de un centro bis  $\mu$ -oxo). Es posible que una pequeña cantidad de este compuesto bis  $\mu$ -oxo fuera la causante de la reactividad. Se ha propuesto también que puede existir un rápido equilibrio entre estos dos isómeros en donde ambos podrían ser responsables de la reacción de hidroxilación. Sin embargo la viabilidad de que la especie oxo sea un intermediario estaría por demostrarse. (Figura 8)

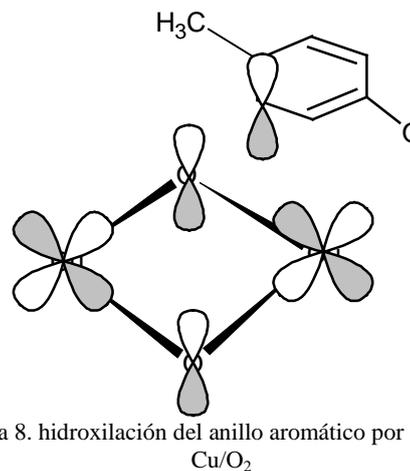


Figura 8. hidroxilación del anillo aromático por el aducto Cu/O<sub>2</sub>

De acuerdo a los estudios químicos y teóricos el proceso de hidroxilación del anillo fenólico por la acción de la tirosinasa se explicaría por medio de un mecanismo de sustitución electrofílica aromática (Se) desde el centro peroxo Cu<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hacia sistema  $\pi$  del anillo aromático (11). Este carácter electrofílico del puente peróxido  $\mu-\eta^2: \eta^2$  ha sido explicado debido a que existe una gran cantidad de carga del centro binuclear Cu (II) haciendo menos negativa el O<sub>2</sub> peróxido (figura 9)

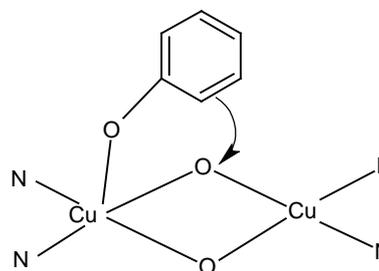


Figura 9 sustitución electrofílica del centro peroxo Cu<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al sustrato fenólico

En cuanto a la actividad catecolasa<sup>23,24,25</sup> los estudios de reactividad en complejos sintéticos de cobre hacia catecoles incorporan tantos factores estructurales como electrónicos como responsables de la actividad catalítica.

Es conocido que cambios relativamente menores en el ambiente por efecto de los ligantes provocarían cambios sustanciales en sus propiedades catalíticas.

Pero no solo se ha estudiado la reactividad de los complejos de cobre hacia sustratos, también se han hecho diversos estudios sobre el mecanismo de acción respecto al tipo de reacción donde especies cobre/dioxígeno son los responsables de la catálisis de oxidación de catecoles para la formación de la quinona correspondiente. Los mecanismos planteados se pueden resumir en el esquema siguiente. Figura 10.

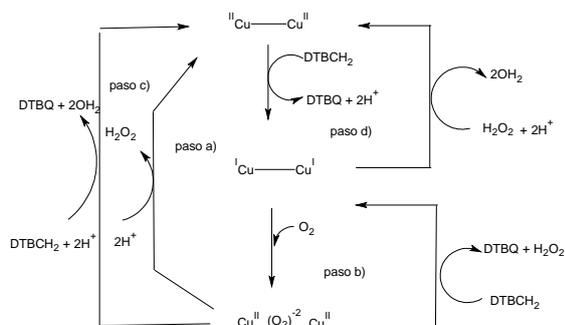
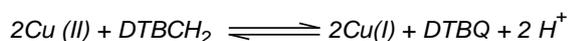


Figura 10 Mecanismos de oxidación de catecoles mediados por complejos binucleares de cobre

Aunque las investigaciones en complejos binucleares de cobre que sirven como modelos enzimáticos han alcanzado grandes progresos aun no está completamente dilucidado como se lleva a cabo los procesos de oxidación sobre substratos externos. El conocimiento del mecanismo daría un mayor conocimiento de cómo operan las reacciones enzimáticas así como dar una base de soporte para desarrollar la síntesis de nuevos catalizadores para oxidaciones selectivas.

Estudios de los mecanismos de reacción realizados por Manzur<sup>11,23</sup> y colaboradores han mostrado que el di 2 piridil metano y sus derivados metilados forman complejos mononucleares con cobre (I) y mononucleares con cobre (II) estos complejos de cobre catalizan la oxidación de fenoles por oxígeno molecular dando el producto de acoplamiento oxidativo al usar como sustrato 2, 5 diterbutil fenol. Los correspondientes complejos de cobre (II) catalizan la oxidación aeróbica de 3, 5 diterbutilcatecol DTBCH<sub>2</sub> a la quinona 3, 5 diterbutil o- benzoquinona DTBQ. Los estudios cinéticos mostraron la existencia del equilibrio



La especie de cobre (I) en estos casos resulta ser activa en el proceso catalítico. Los datos cinéticos se pueden racionalizar suponiendo la interacción del complejo cuproso con oxígeno para generar una especie superoxo. La existencia de este equilibrio así como la posible participación de una especie superoxo en la oxidación catalítica del catecol en lugar de una reacción irreversible es una propuesta novedosa en el estudio de estos catalizadores.

#### 4. Actividad fenolasa de complejos de cobre

Muchos modelos sintetizados que intentan emular la acción tirosinasa<sup>13,30</sup> no han mostrado actividad monofenolasa probablemente la razón se encuentre en que la formación de un aductofenolato con el centro de cobre no ocurre en uno de los pasos del

mecanismo de reacción, por lo que no provocaría la transferencia electrónica deseada y la posterior hidroxilación del sustrato.

Además de lo anterior algunos factores de tipo estérico y geométrico podrían influenciar en la capacidad de hidroxilar a fenoles como por ejemplo el hecho de que el sustrato de tirosinasa enlace a un centro de cobre de ambiente tetracoordinado (CuI) el cual pasaría posteriormente hacia un re-arreglo bipiramidal trigonal (CuII) adecuando de esta forma un sitio adecuado para que se produzca la entrada del sustrato fenólico.

Por lo tanto los éxitos encontrados en modelos químicos mono y binucleares que propician la formación de un aductofenolato tienen que ver con la semejanza con el modelo biológico original.

### 5. Análisis comparativo con sistemas reportados.

#### 5.1 Sistemas sintéticos

La actividad catalítica de un gran número de complejos de cobre. Los resultados se han correlacionados con diversos factores entre los que destacan factores estéricos y potenciales de oxidación-reducción. Malachowski y colaboradores han reportado la actividad catalítica de algunas series de complejos mononucleares de cobre (II) con los ligandos tetradentados (cita) tris(2-piridilmetil) amina, tpyma, tris(2-piridiletil) amina, tpyea, tris(3,5 dimetilpirazol-1-il-etil) amina, tpzea y tris(3,5-dimetil-pirazol-1-il-metil) amina tpzma (figura)

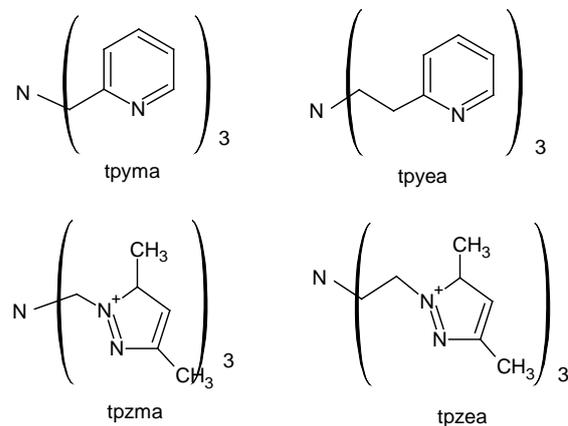


Figura 11 Ligantes utilizados por Malachowski.

Para explicar las diferencias en la actividad catalítica de esta serie de complejos se consideran factores como propiedades electroquímicas, geometría alrededor del centro metálico, la naturaleza de los átomos donadores de electrones, su basicidad y los factores estéricos impuestos por los ligandos. Se encuentran que un factor importante sería el potencial de reducción de manera que

exista un balance entre la facilidad de reducción y subsiguiente reoxidación por el oxígeno molecular.

Si bien este sería un requisito necesario no es suficiente, ya que complejos con casi idénticos potenciales muestran muy diferentes actividad. Otro factor importante sería el efecto estérico. Diferencias en el efecto estérico se pueden manifestar de varias maneras, estas incluyen diferencias en la hidrofobicidad de los complejos, accesibilidad del sustrato al ion metálico debido al volumen del ligante y el match estérico entre el sustrato y el complejo. Se ha demostrado que la transferencia electrónica desde el catecol al cobre (II) solo puede tener lugar después que se forme el intermediario Cu-catecolato. Esto requiere de un sitio de coordinación vacante accesible en el metal para que la coordinación del catecol ocurra.

Chyn y Urbach<sup>3</sup> reportan la actividad catalítica de dos complejos binucleares  $(\text{Cu}_2(\text{BLEP})(\text{OH}))^{+2}$  (1) y  $(\text{Cu}_2(\text{LEP})_2)^{+2}$  (2) (figura 11)

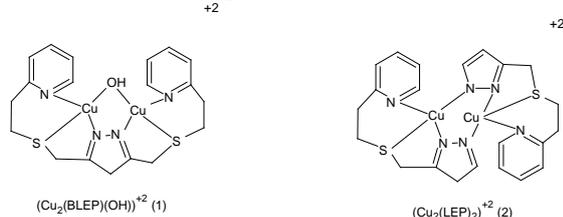


Figura 11 Complejos utilizados por Chyn y Urbach

La velocidad de oxidación en ambos casos resulta ser de primer orden en complejos y oxígeno e independiente de la concentración del DTBCH<sub>2</sub>. Las constantes de velocidad específicas resultaron ser  $1.17 \times 10^2$  y  $1.29 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  respectivamente. Así, el complejo (1) que contiene el ligante binucleante es mejor catalizador por dos órdenes de magnitud. Esta diferencia se puede generar debido a una mejor interacción entre la unidad binuclear y el oxígeno.

Si el grupo OH puente se pierde debido a la reducción, entonces existiría una muy favorable interacción vía formación de una especie  $\mu$ -peroxo-di-cobre (II) donde el peróxido puente puede unir dos posiciones ecuatoriales de ambos átomos de cobre. El complejo (2) puede disociarse en algún grado en la forma reducida negando así las ventajas del complejo (1). En general la actividad catalítica es superior a la mostrada por complejos mononucleares, lo que muestra la ventaja de dos centros de cobre para la oxidación vía dos electrones del DTBCH<sub>2</sub>.

Otros autores<sup>24-28</sup> han estudiado la actividad catalítica de complejos binucleares de cobre (II) en diversos medios y encuentran una dependencia de la velocidad de la reacción con la concentración del

catecol a bajas concentraciones alcanzando un valor asintótico con el aumento de la concentración. Un tratamiento sobre la base del modelo de Michaelis-Menten originalmente desarrollado para catálisis enzimática permite describir los resultados. Aunque el mecanismo puede ser mucho más complicado, este tratamiento es suficiente para la descripción de la cinética en muchos casos.

Las diferencias en actividad se relacionan con factores geométricos, principalmente incluyendo la distancia Cu-Cu en el centro binuclear. Complejos en conformaciones relajadas energéticamente favorables exhiben una actividad pobre. En cambio estructuras de coordinación más tensionadas son más activas. Otro factor importante está relacionado con la facilidad de interacción con el sustrato para la formación del intermediario Cu-catecolato. El uso de ligante voluminosos que imponen un gran impedimento estérico alrededor de los centros metálicos resulta en una actividad disminuida.

Los mecanismos de reacción postulados plantean una primera etapa donde el complejo de cobre (II) interactúa con el catecol generando la quinona con la consiguiente reducción a la especie de cobre (I) esta reacciona con el oxígeno para dar un intermediario Cu-O<sub>2</sub> generalmente del tipo peroxo regenerando la especie de Cu(II) o interactuando con el catecol.

La cinética observada depende de las velocidades relativas de las distintas etapas posibles. Es así como algunos sistemas muestran una primera fase muy rápida mientras que la segunda puede ser muy lenta dependiendo de la reactividad del complejo de Cu(I) formado en la primera etapa.

En otros casos la oxidación de la especie de Cu(I) es rápida y entonces la velocidad de formación de la quinona depende de la velocidad de la reacción de transferencia de electrones en el intermediario catecolato. Por último la especie intermediaria Cu-O<sub>2</sub> puede reaccionar con el catecol de varias maneras. Esto hace que la comparación entre distintos sistemas catalíticos sea muy difícil, ya que para obtener información confiable respecto del efecto de alguno de los factores que modulan la actividad es necesario que el mecanismo a través del cual ocurre la reacción sea el mismo.

En los sistemas estudiados en complejos con ligantes binucleares metaxilil<sup>29,30</sup> solo se compararon los resultados con ligantes L1 y L3. El ligante metilado resulta mejor catalizador que aquellos sin metilar aunque el potencial de oxidación es más positivo con el ligante metilado (0,22 y 0,3 V) para L1 y L3 para la oxidación de la

especie Cu(I) el corrimiento del potencial de oxidación hacia potenciales más positivos al incorporar grupos metilo en la posición 6 del anillo ha sido observado para otros ligantepiridínicos este efecto se ha explicado por la repulsión estérica entre el grupo metilo y el centro metálico que provoca cambios en la geometría alrededor del centro metálico. La mayor actividad catalítica observada con el complejo con el ligante L<sup>3</sup> se podría explicar suponiendo una mayor reactividad del intermediario Cu/oxígeno inducida por el efecto estérico del grupo metilo en una estructura mas distorsionada.

Si se comparan los parámetros de MichaelisMenten de los complejos reportados en la literatura con aquellos correspondientes a estos Cu complejos se puede observar que son del mismo orden de magnitud; El complejo con el ligante L2 actúa a través de un mecanismo diferente donde se formaría una especie intermediaria Cu catecolato que finalmente generaquinona por reacción con el oxígeno. Este comportamiento donde la transferencia electrónica no ocurre en la especie Cu catecolato ha sido observado para otros complejos con ligantes similares.

Un mecanismo resumido de los diversos pasos a través de los cuales puede ocurrir la oxidación del catecol catalizada por complejos de cobre (I) o de cobre (II) se muestra en la figura.

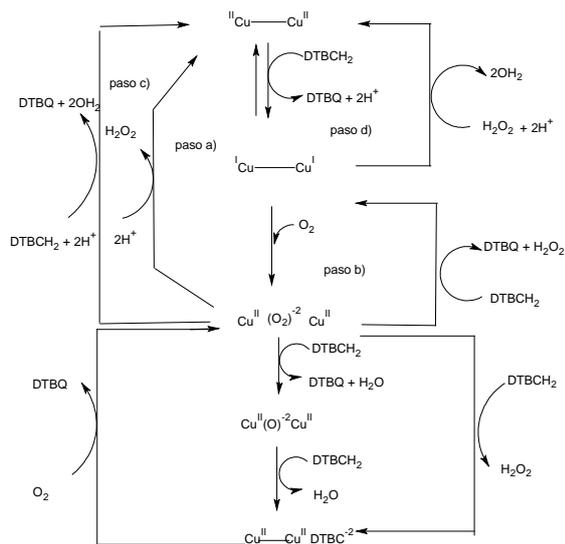


Figura 12.- posibles mecanismos de oxidación de 3-5 diterbutilcatecol catalizado por complejos de cobre

### 5.2Sistemas biológicos

El mecanismo de reacción más aceptado para la actividad difenolasa en la tirosinasa (*Agaricusbisporus*) es aquella que toma en consideración la presencia de tres formas de la enzima (oxi, deoxi, met) siguiendo el siguiente esquema.

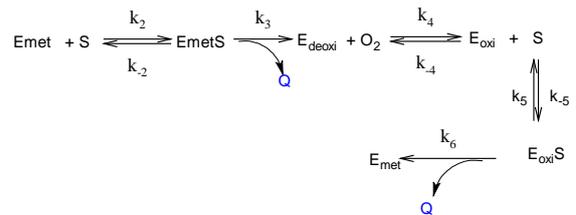


Figura 13 mecanismos de reacción cinética para la actividad difenolasa de la tirosinasa.

En este mecanismo la especie deoxi únicamente puede reaccionar con oxígeno pero no con el catecol por otro lado las especies que reaccionan con el catecol son las formas met y oxi<sup>3</sup>. Las etapas limitantes de la velocidad de reacción en este mecanismo corresponden a las etapas de formación de los aductos enzima sustrato, siendo la velocidad de reacción en la forma met más rápida que con la forma oxi. Esta diferencia en actividad se atribuye a la dificultad de acceso del catecol al sitio activo que estaría modulando por factores de tipo estérico y de polaridad para las dos formas de la enzima.

En sistemas modelos sintéticos se podría postular también que la especie de cobre (II) (que correspondería a la forma met en la tirosinasa) reacciona con el sustrato para generar la quinona y la forma deoxi sin que aparezca explícito la formación de un aducto catalizador sustrato. La forma deoxi es la que reaccionaría en estos sistemas con el oxígeno para generar la especie oxi.

### 6. Conclusiones

La influencia de la estructura del catalizador sobre la actividad catalítica estaría relacionada principalmente con factores estéricos así como por potenciales de oxido reducción. Aparentemente existe un intervalo óptimo de potenciales necesario para que ocurra la catálisis. Sin embargo este solo sería un requisito necesario pero no suficiente.

Por lo tanto los factores principales que afectan la actividad catalítica de los complejos de cobre en la oxidación de catecoles por oxígeno molecular se pueden destacar factores estéricos y potenciales de oxido reducción.

Los mecanismos a través de los cuales puede ocurrir la oxidación del 3-5 diterbutilcatecol catalizada por complejos de cobre incluyen diversos pasos donde dos de las etapas claves corresponden a la interacción del complejo de cobre (I) con el oxígeno molecular y la posterior reacción del intermediario formado con el sustrato.

Dependiendo de las velocidades relativas de las etapas individuales se obtienen cinéticas distintas para los diferentes catalizadores. Este hecho hace

que la comparación entre distintos sistemas se haga difícil ya que se requiere un mecanismo común para evaluar el efecto individual de algunos de los factores que determinan la actividad.

Las diferencias estructurales de los ligantes hacia el complejo de cobre se manifiestan no solo en una diferencia de actividad de los complejos formados

## 7. Bibliografía.

- 1.-Kaim, Wolfgang; Schwederski, Brigitte. *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life: An Introduction and Guide* (2001), ISBN 13: 9780471943693.
- 2.-Alekseev, V. A.; Antipin, B. N. 1976. Toxicological characteristics and symptom complex of the acute phenol poisoning of certain freshwater crustaceans and mollusks. *Abstract: Chem. Abs.* 85: 117520r.
- 3.- J Kopin (1968) "Biosynthesis and metabolism of catecholamines" 29 654.
- 4.- K.D. Karlin *progress in Inorganic Chemistry. Vol 57* (2012) by Jhon Wiley & Sons. ISBN 978-1-118-01063-1.
- 5.-C.S. Foote, JS. Valentine (1995) "Active Oxygen in Chemistry" vol 2 de Balckie Academic & Profesional USA.
- 6.- Alexander Shilov and GeorgiyShul'pin. *Activation and Catalytic reactions of saturated Hydrocarbons in the presence of metal complexes* (2001) KluwerAcademic Publisher ISBN 1-4020-0420-6
- 7.- B. Loeb I. Crivelli C. Andrade (1995) *Inorganic ChimicaActa* 21, 27
- 8.- E. Solomon, M Lowery (1992) *Chem Rev* 92 521.
- 9.-K.Karlin Y. Gultneh (1985) *Journal Chemical Education* 62, 883 988.
- 10.- A. F. Cotton and G. Wilkinson (1980) *Advance Inorganic Chemistry"* Ed 4 John Willey and Sons New York.
- 11.- E. Spodine and J Manzur (1992) *Coordination Chemistry review* 119 171.
- 12.-Nishida K takahashi H. Kuramoto (1981) *InorganicaChimica Acta* 54 103.
- 13.- T Hashimoto T Morooka (1991) *J Am. Chem. Society* 113 5664.
- 14.- M. Malachowski B. Dorsey (1996) *inorganic ChimicaActa* 249 85 92.
- 15.-Casella A. Perotti E. Monzani (1999) *Inor. Chem.* 38 5259.
- 16.- IlariaGamba, Patrick Gamez, Enrico Monzani, Luigi Casella, IlpoMutikainen, Jan Reedijk, *Selective Copper-Mediated Halogenation of Aromatic Rings Under Mild Conditions. European Journal of Inorganic Chemistry, Volume 2011, Issue 28, pages 4360–4368, October 2011.*
- 17.-IlariaGamba, Sara Palavicini, Enrico Monzani, Luigi Casella. *Catalytic Sulfoxidation by Dinuclear Copper Complexes. Chemistry - A European Journa, Volume 15, Issue 47, pages 12932–12936, December 7, 2009*
- 18.-Mohamed El Kodadi, FouadMalek, RachidTouzani, AbdelkrimRamdani. *Synthesis of new tripodal ligand 5-(bis(3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-ylmethyl)amino)pentan-1-ol, catecholase activities studies of three functional tripodalpyrazolyl N-donor ligands, with different copper (II) salts CatalisisComunications, Volume 9, Issue 5, 20 March 2008, Pages 966–969* 50.-
- 19.- Y. Toubi , R. Touzani , S. Radi , S. El Kadiri, *Synthesis, characterization and catecholase activity of copper (II) complexes with bispyrazole tri-podal Ligands, J. Mater. Environ. Sci.* 3 (2) (2012) 328-341
20. Bhardwaj, V.K., Aliaga-Alcalde, N., Corbella, M., Hundal, G., *Inorg. Chim. Acta* 363 (2010) 97.
21. Yang, M., Park, W.J., Yoon, K.B., Jeong, J.H., Lee, H., *Inorg. Chem. Commun.* 14 (2011) 189.
- 22.-Belén Abarca , Ibon Alkorta , Rafael Ballesteros , Fernando Blanco , MimounChadlaoui , José

Elguero and FatemehMojarrad. 3-(2-Pyridyl)-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]pyridines. An experimental and theoretical (DFT) study of the ring-chain isomerization. *Org. Biomol. Chem.*, 2005,3, 3905-3910

23.-Jorge Manzur Ana MaríaGarcía, Andrés Vega, Andrés Ibañez: Synthesis and structure of copper (II) complexes with L-OH (L-OH = 2,6-bis-[N-(2-pyridylethyl)-formidoyl]-4-methylphenol), *Polyhedron* Volume 26, Issue 1, 2 January 2007, Pages 115–122.

24.-Rosa Faustino Brissos, Silvia García, Andreu Presa, Patrick Gamez. bio-related copper mediated oxidative processes. *Comments on Inorganic Chemistry*, 32: 219–245, 2011

25.-I. G. Tarkhanova, M. G. Gantman, T. N. Rostovschikova. The Evolution of Reactive Ligands in the Catalysis of Radical Processes by Copper Complexes. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*, 187:88–100, 2012.

26.-Ernest Chi Fru. copper biogeochemistry: a cornerstone in aerobic methanotrophic bacterial

ecology and activity? *Geomicrobiology Journal*, 28:601–614, 2011.

27.- Iryna A. Koval, Catherine Belle KatalinSelmeczi Christian Philouze, Eric Saint-Aman Anna Maria Schuitema, Patrick Gamez Jean-Louis Pierre, Jan Reedijk. Catecholase activity of a 1-hydroxodicopper(II) macrocyclic complex: structures, intermediates and reaction mechanism. *J BiolInorgChem* (2005) 10: 739–750.

28.-Lanying Q. Hatcher, Kenneth D. Karlin. Oxidant types in copper-dioxygen chemistry: the ligand coordination defines the Cun-O2 structure and subsequent reactivity. *J BiolInorgChem* (2004) 9: 669–683.

29.-R. Calero, J. Manzur. E. Spodine. Structural characterization of Cu(bpma)2.(BF4)2, (bpma: N-{[3-(dimethoxymethyl) phenyl]methylidene}[di-(2-pyridyl)]methanamine.). *Journal of Coordination Chemistry* 57(5) 435 -434 (2004).

30.-Rolando Calero, Andrés Vega, Ana MaríaGarcía, EvgeniaSpodine, Jorge Manzur. Oxidation and catalytic activity of a binuclear copper(I) complex with a meta-xylyl spacer ligand. *J. Chil.Chem. Soc*, 48, 85-88, (2003).

