

**ESTUDIO DEL EFECTO SOBRE EL LIGANDO DE UN COMPLEJO
ORGANOIRIDIO EN LA REGENERACIÓN DE UN COFACTOR ENZIMÁTICO**

KAROL VANESSA SANDOVAL QUIÑONEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2016**

**ESTUDIO DEL EFECTO SOBRE EL LIGANDO DE UN COMPLEJO
ORGANOIRIDIO EN LA REGENERACIÓN DE UN COFACTOR ENZIMÁTICO**

KAROL VANESSA SANDOVAL QUIÑONEZ

Trabajo de grado realizado en la Universidad de Lille 1
presentado como requisito para obtener el título de:
Ingeniera Química

Director

MICKAËL CAPRON, PhD

Codirectoras

MARIE GUEHL, M. Sc.

PAOLA MARADEI, PhD

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2016

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quiero darle gracias a Dios por la vida, la salud y todas las bendiciones que recibo a diario, por ser el motor y el fundamento de mi vida, porque lo que soy y lo que he hecho han sido obra de Él, de su divina voluntad.

A mis padres, Marco Antonio Sandoval y Luz Marina Quiñonez por ser mi ejemplo a seguir, por su apoyo constante e incondicional a lo largo de mi vida y por su formación moral y espiritual, pues han hecho de mi la mujer que soy actualmente.

A toda mi familia, especialmente a mis hermanos Marcos David Sandoval y Cristian Felipe Sandoval, por hacer mis días más felices, por su compañía y su paciencia durante mi vida.

A la profesora María Paola Maradei por todas sus enseñanzas, por la confianza que depositó en mí y por la gran oportunidad que me dio para realizar esta pasantía de investigación, una de las mejores experiencias de mi vida.

Al profesor Mickaël Capron y a Marie Guehl por permitirme trabajar junto a ellos en este gran proyecto, por todas sus enseñanzas pues fueron fundamentales para el éxito de este trabajo, por su apoyo y su hospitalidad.

A todo el grupo de investigación de Valoración de biomasa, especialmente a Marine, Dimitri, Leila, Soraya, Ayman y a Claudia Tavera por acogerme durante mi estancia, por hacerme sentir como en casa y por toda su colaboración.

A Mónica Mendoza por su gran amistad y apoyo incondicional, por todas sus enseñanzas y por su tiempo, pues a pesar de la distancia hizo parte de esta investigación.

A mis amigos Giordan Murillo, Natalia Pabón, Daniel Moncada y Cristian Santamaría, por su valiosa amistad durante mi vida y por todas las experiencias que Dios nos ha permitido compartir en estos años.

A Lazos de Amor Mariano por ser esa hermosa comunidad que me permitió crecer espiritual y personalmente para ser ahora un profesional integral, y a todas las personas que me encomendaron en sus oraciones durante mi pasantía de investigación, pues este hermoso regalo también se vio reflejado en el éxito de mi proyecto.

A mi alma máter, la Universidad Industrial de Santander, por ser una institución excelente y por acompañarme durante estos últimos años en mi proceso de formación profesional.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. MARCO TEÓRICO	19
1.1. Catálisis híbrida	19
1.2. Regeneración del cofactor enzimático	19
1.2.1. Regeneración enzimática:	21
1.2.2. Regeneración química	23
1.3. Reacción de interés	25
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	29
2.1. Materiales y reactivos	29
2.2. Selección de los ligandos	30
2.3. Síntesis de los complejos	31
2.4. Caracterización de los complejos	31
2.5. Prueba de regeneración del cofactor	32
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	34
3.1. Síntesis de los complejos	34
3.2. Caracterización de los complejos	35
3.3. Prueba de regeneración del cofactor	36
3.3.1. Actividad de los complejos	37

4. CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	50

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estructura del NAD(P) ⁺ y NAD(P)H	20
Figura 2. Principio de regeneración enzimática con co-sustrato y co-enzima	22
Figura 3. Compuestos base para la producción de HMF y sus derivados	26
Figura 4. Mecanismos de reacción para la producción de fructosa	27
Figura 5. Estructura del complejo [Cp*Ir(fenantrolina)(H ₂ O)] ²⁺	28
Figura 6. Metodología de investigación	29
Figura 7. Ligandos de los diferentes complejos a sintetizar	30
Figura 8. Complejos organoiridio sintetizados	34
Figura 9. Espectros de RMN ¹ H del complejo 2. (A) Espectro después de la síntesis donde la señal del Cp* presenta el solapamiento de dos bandas. (B) Espectro después de recrystalizar, presentando un singlete definido en la señal del Cp*	36
Figura 10. Espectros de RMN de los complejos con ligandos 2, 3, 4, 5 y 8, en la región del hidruro-complejo, a los 5, 30, 60, 120 y 210 minutos de reacción	37

Figura 11. Espectro RMN ^1H del complejo 4 presentando (A) la descomposición del NAD $^{+}$ desde los 60 minutos, (B) aparición de una señal desconocida y (C) descomposición del complejo a partir de los 30 minutos de reacción	39
Figura 12. Dependencia de la concentración en relación al tiempo de las especies observadas durante la reacción de regeneración, correspondientes a los complejos (A) 2, (B) 3, (C) 4, (D) 5 y (E) 8	41
Figura 13. Medida de la selectividad en base a la concentración de productos de descomposición	42
Figura 14. Mecanismo propuesto para la regeneración del cofactor NADH mediante el complejo organoiridio $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{fenantrolina})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	51
Figura 15. (A) Espectro RMN ^1H del ligando 2 (4-metil-1,10- fenantrolina) en CD_2Cl_2 . (B) Espectro RMN ^1H del complejo sintetizado con el ligando 2 en D_2O	52
Figura 16. (A) Espectro RMN ^1H del ligando 3 (5-cloro-1,10- fenantrolina) en CD_2Cl_2 . (B) Espectro RMN ^1H del complejo sintetizado con el ligando 3 en D_2O	53
Figura 17. (A) Espectro RMN ^1H del ligando 4 (5-nitro-1,10- fenantrolina) en CD_2Cl_2 . (B) Espectro RMN ^1H del complejo sintetizado con el ligando 4 en D_2O	54
Figura 18. (A) Espectro RMN ^1H del ligando 5 (4, 7-dimetoxi-1,10- fenantrolina) en CD_2Cl_2 . (B) Espectro RMN ^1H del complejo con el ligando 5 en CD_2Cl_2	55
Figura 19. (A) Espectro RMN ^1H del ligando 6 (1,10- fenantrolina-4, 7-diona) en CD_2Cl_2 . (B) Espectro RMN ^1H del complejo sintetizado con el ligando 6 en D_2O	56

Figura 20. (A) Espectro RMN ^1H del ligando 8 (3, 4, 7,8-tetrametil-1,10- fenantrolina) en CDCl_3 . Tomado de Spectral Database for Organic Compounds, SDBS. (B) Espectro RMN ^1H del complejo sintetizado con el ligando 8 en D_2O 57

Figura 21. Espectros del (A) NAD^+ , (B) NADH y (C) complejo 8 sintetizado, con las señales escogidas para la integración. (A) y (B) 58

Figura 22. Espectros RMN ^1H de 15 mM de 1,4-NADH con 1 mM de complejo con ligando 2 (4-metil-1,10- fenantrolina) en 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O a 310 K, a diferentes tiempos de la reacción. Derecha: región del hidruro complejo (x4) 60

Figura 23. Espectros RMN ^1H de 140 mM de 1,4-NADH con 15 mM de complejo con ligando 3 (5-cloro-1,10- fenantrolina) en 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O a 310 K, a diferentes tiempos de la reacción. Derecha: región del hidruro complejo (x2) 61

Figura 24. Espectros RMN ^1H de 30 mM de 1,4-NADH con 3 mM de complejo con ligando 4 (5-nitro-1,10- fenantrolina) en 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O a 310 K, a diferentes tiempos de la reacción. Derecha: región del hidruro complejo (x1) 62

Figura 25. Espectros RMN ^1H de 15 mM de 1,4-NADH con 1 mM de complejo con ligando 7 (4, 7-dimetoxi-1,10- fenantrolina) en 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O a 310 K, a diferentes tiempos de la reacción. Derecha: región del hidruro complejo (x5) 63

Figura 26. Espectros RMN ^1H de 15 mM de 1,4-NADH con 1 mM de complejo con ligando 8 (3, 4, 7, 8-dimetoxi-1,10- fenantrolina) en 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O a 310 K, a diferentes tiempos de la reacción. Derecha: región del hidruro complejo (x4) 64

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Rendimientos de los complejos sintetizados	34
Tabla 2. TON y TOF para cada uno de los complejos sintetizados	38
Tabla 3. Señales escogidas de los espectros ^1H RMN para la integración	59
Tabla 4. Número de hidrógenos correspondientes a la señal escogida de cada especie	65

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A. Mecanismo de reacción propuesto para la regeneración del cofactor NAD ⁺	51
ANEXO B. Espectros RMN ¹ H de los ligandos con sus respectivos complejos sintetizados	52
ANEXO C. Señales escogidas para la integración	58
ANEXO D. Espectros RMN H obtenidos en las pruebas de regeneración con los complejos sintetizados	60
ANEXO E. Cálculos realizados	65

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DEL EFECTO SOBRE EL LIGANDO DE UN COMPLEJO ORGANOIRIDIO EN LA REGENERACIÓN DE UN COFACTOR ENZIMÁTICO*

AUTOR: KAROL VANESSA SANDOVAL QUIÑONEZ**

PALABRAS CLAVES: CATÁLISIS HÍBRIDA, BIOMASA, COFACTOR DE NICOTINAMIDA, REGENERACIÓN DEL COFACTOR, COMPLEJO ORGANOMETÁLICO.

DESCRIPCIÓN: La catálisis híbrida es un nuevo concepto que surge como alternativa para el mejoramiento de las tecnologías de procesamiento de la biomasa, integrando la biocatálisis y la catálisis química en un sólo paso. Una de las aplicaciones que se ha venido desarrollando es la regeneración de los cofactores de nicotinamida (NADH/NAD⁺), debido al amplio uso de los cofactores en procesos biocatalíticos y al alto costo que implica emplearlos en cantidades estequiométricas en un proceso a gran escala. Ésta se ha llevado a cabo mediante complejos organometálicos, especialmente complejos arenos de Ir (III), Rh (III) y Ru (II), que actúan como catalizadores regioselectivos para la regeneración y pueden acoplar reacciones de biosíntesis enzimática, obteniendo buenos resultados.

En el presente trabajo se analiza el efecto del ligando de complejos derivados del $[(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ en la regeneración del cofactor NAD⁺ mediante RMN ¹H, para lo cual se sintetizaron ocho complejos con diferentes sustituyentes en el ligando de fenantrolina. Se detectaron concentraciones de NAD⁺ e hidruro-complejo a partir de 5 minutos de reacción, evidenciando el logro de la regeneración del NADH. Se encontró que los complejos con mayor actividad catalítica y rapidez ($\text{TON}_{\text{máx}}=1.92$ y $\text{TOF}_{\text{máx}}=12.92 \text{ h}^{-1}$) poseen grupos atractores, caso contrario ocurrió con la selectividad. Además, el comportamiento de las curvas de concentración demostró la generación de productos de descomposición y por tanto, los complejos no fueron completamente selectivos. Finalmente, el complejo con el ligando 5-cloro-1,10-fenantrolina, con un grupo atractor débil, presentó las mejores características entre los complejos sintetizados.

*Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: Ph. D. Mickaël Capron, M. Sc. Marie Guelh, Ph. D. María Paola Maradei García.

ABSTRACT

TITLE: EFFECT STUDY ON THE LIGAND OF AN ORGANOIRIDIUM COMPLEX ON AN ENZYME COFACTOR REGENERATION*

AUTHOR: KAROL VANESSA SANDOVAL QUIÑONEZ**

KEYWORDS: HYBRID CATALYSIS, BIOMASS, NICOTINAMIDE COFACTOR, COFACTOR REGENERATION, ORGANOMETALLIC COMPLEX

DESCRPTION: Hybrid catalysis is a new concept which emerges as an alternative for improving biomass processing technologies by biocatalysis and chemical catalysis integration in a one pot process. Regeneration of nicotinamide cofactors (NADH/NAD⁺) is one of the applications that is being developed due to the large usage in biocatalytic processes and the high cost of using them in stoichiometric amounts in a large scale process. This has been carried out by organometallic complexes especially arene Ir (III), Rh(III) and Ru(II) complexes which act as regioselective catalysts for regeneration and can couple enzymatic biosynthesis reactions, getting good results.

This work analyzes the effect of the ligand of complex $[(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ derivatives in the regeneration of NAD⁺ cofactor by means of ¹H NMR spectroscopy. Eight complexes with different ligand substituents were synthesized for that purpose. Concentrations of NAD⁺ and hydride-complex were detected from 5 minutes of reaction therefore regeneration of NADH was proved. It is found that complexes with higher catalytic activity and fastness ($\text{TON}_{\text{máx}}=1.92$ y $\text{TOF}_{\text{máx}}=12.92 \text{ h}^{-1}$) have electron withdrawing groups, opposite case occurred with selectivity. Moreover, the behavior of concentration curves demonstrated a production of decomposition products then complexes were not completely selective. Finally, complex with 5-chloro-1,10-phenanthroline ligand which has a weak electron withdrawing group showed the best characteristics among the synthesized complexes.

*Bachelor Thesis

** Physicochemical Engineering Faculty. Chemical Engineering School. Directors: Ph. D. Mickaël Capron, M. Sc. Marie Guelh, Ph. D. María Paola Maradei García.

INTRODUCCIÓN

El calentamiento global, la contaminación ambiental, la disminución del consumo de combustibles fósiles y el suministro sostenible de energía son algunos de los principales focos de atención a nivel mundial. Así mismo, la biomasa, una abundante fuente de carbono, ha sido considerada como una de las alternativas de energía renovable para la producción de biocombustibles y diferentes productos de valor agregado. Todo esto conlleva a que el concepto de biorrefinería tome cada vez más auge con el paso de los años.

En los procesos de biorrefinería, la biomasa, como materia prima, es sometida a procesos de separación y pretratamientos con el fin de obtener productos intermedios, los cuales son llevados posteriormente a diferentes procesos de conversión biológica, química, catalítica y/o térmica para la obtención de energía y diversos productos. Estos últimos procesos son determinantes, especialmente la conversión catalítica de la biomasa, que ha sido motivo de muchas investigaciones en las últimas décadas, pues se ha convertido en parte clave y fundamental en el desarrollo de las biorrefinerías.

Se abre entonces una puerta en el campo de la catálisis para el estudio y la generación de nuevos catalizadores para el procesamiento de la biomasa. Dentro de ello, un nuevo concepto llamado catálisis híbrida, ha empezado a surgir con el fin de integrar las ventajas de la biocatálisis y la catálisis química tales como alta selectividad, alta productividad y el adecuado tratamiento de la biomasa.

En la catálisis de la biomasa, los procesos de catálisis enzimática juegan un papel importante y son muy llamativos debido a su alta selectividad, actividad y especificidad. Sin embargo, uno de los inconvenientes que impide llevar estos procesos a escala industrial, es el alto costo que implican muchas coenzimas y/o cofactores necesarios para llevar a cabo gran parte de las reacciones catalizadas enzimáticamente, especialmente, el de las coenzimas de nicotinamida NAD(P)H/NAD(P)⁺, unas de las más usadas para estas reacciones.

En vista de lo anterior, una de las soluciones propuestas desde hace algunas décadas es la implementación de métodos de regeneración de las coenzimas, con el fin de encontrar métodos eficientes, sencillos, económicos, con alta selectividad y fáciles de integrar dentro del sistema principal de reacción enzimática. Métodos tanto químicos, enzimáticos, electroquímicos y fotoquímicos han sido estudiados y desarrollados, sin embargo, el nuevo campo que hay por explorar con la catálisis híbrida podría ofrecer procesos de regeneración económicos y rápidos al acoplar catalizadores químicos regioselectivos con el sistema de reacción enzimática.

Algunos de los catalizadores que han sido estudiados para este propósito son aquellos que pertenecen al conjunto de los complejos organometálicos. Dichos complejos, entre ellos complejos arenos de Ir (III), Rh (III) y Ru (II), tienen como mecanismo de acción las reacciones de transferencia de hidruro entre los cofactores NAD⁺ y NADH, y se ha encontrado que actúan regioselectivamente en la oxidación y reducción de dichos cofactores, obteniendo buenos resultados. No obstante, existen muchos factores que pueden afectar el mecanismo de reacción como la temperatura, pH, la concentración de los compuestos, los tipos de ligando de los complejos organometálicos, entre otros.

En los complejos organometálicos, los diferentes tipos de ligandos confieren gran variedad de características y propiedades, por tanto, el efecto que éstos tienen en los mecanismos de regeneración debe convertirse en un gran campo de estudio. Se propone en el presente trabajo estudiar el efecto que tienen diferentes ligandos derivados de la fenantrolina en un complejo organoiridio para la regeneración del cofactor NAD⁺.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. CATÁLISIS HÍBRIDA

La catálisis híbrida es la combinación, en un solo proceso, de la catálisis química y la biocatálisis. Se conoce que ambos tipos de catálisis son aplicados en reacciones subsecuentes en algunos procesos, sin embargo, la integración de éstos en uno solo es ahora un nuevo campo de investigación (Dumeignil, 2011).

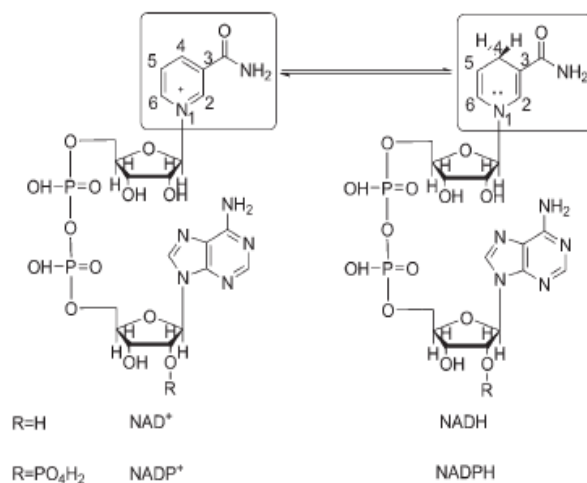
Los catalizadores tanto biológicos como químicos tienen, cada uno, diversas ventajas, pero su integración permite el desarrollo de mejores sistemas. La catálisis híbrida puede ofrecer alta productividad, característico de los catalizadores químicos y a su vez alta selectividad, principal ventaja de un biocatalizador.

1.2. REGENERACIÓN DEL COFACTOR ENZIMÁTICO

Para lograr la actividad catalítica, las oxidorreductasas requieren usualmente de coenzimas o cofactores, los cuales son moléculas o iones que son utilizados por las enzimas para ayudar a catalizar las reacciones (Broderick, 2001), pues contribuyen en el transporte de hidrógeno, electrones, oxígeno y otros átomos o moléculas entre reacciones acopladas (Wu, Tian, Song, Liu, & Yang, 2013). Algunas de las coenzimas/cofactores más importantes y comúnmente utilizadas son la β -nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y su forma reducida, NADH, (Figura 1). De acuerdo con Hong Wu *et al.* (2013), el 80% de las oxidorreductasas conocidas

necesitan NAD(H) como coenzima, representando así el tipo de enzimas más grande que se encuentra involucrado en reacciones de oxidación/reducción. Debido a sus diversas aplicaciones, el NAD⁺ y el NADH son los cofactores de mayor importancia a nivel bioquímico. Sin embargo, sus altos precios han sido un obstáculo para emplearlos en los procesos a gran escala, ya que estos cofactores se necesitan en cantidades estequiométricas (los precios por gramo de cofactor de Sigma-Aldrich Co. Ltda. son 56.50 y 134.50 USD para el NAD (N0 632) y el NADH (N8 129), respectivamente). Por esta razón, diferentes métodos de regeneración se han venido desarrollando, con el fin de poder emplear dichas coenzimas en múltiples ciclos.

Figura 1. Estructura del NAD(P)⁺ y NAD(P)H.



Fuente: Tomado de Hong Wu *et al.*, 2013.

Cuatro principales métodos han surgido para la regeneración de los cofactores, siendo las regeneraciones enzimática y química los mecanismos más destacados debido a las ventajas que ambos pueden ofrecer, no obstante, éstos aun cuentan

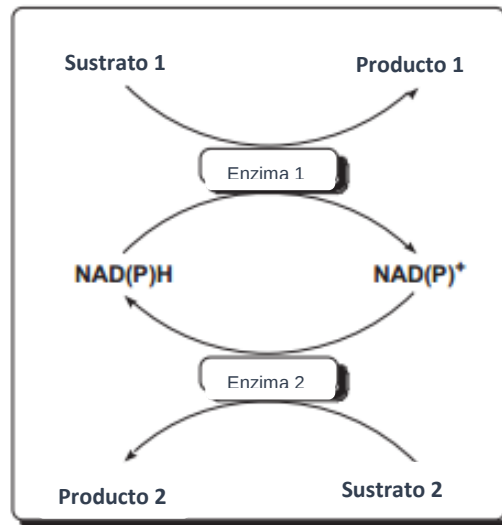
con varios inconvenientes para su aplicación a nivel industrial. Los métodos electroquímicos y fotoquímicos también tienen grandes aplicaciones, emplean bajos niveles energéticos y son amigables ambientalmente, sin embargo, con las tecnologías actuales, estos métodos son menos eficientes que los otros, pues para garantizar que esos mecanismos sean completamente rentables, se deben desarrollar fotosensibilizadores de luz visible, electrocatalizadores, buenos mediadores de electrones, entre otros (Wu, Tian, Song, Liu, & Yang, 2013). La presente investigación se centrará en la integración de los dos primeros métodos de regeneración.

1.2.1. Regeneración enzimática:

1.2.1.1. Principio: La regeneración del cofactor mediante un método enzimático requiere una segunda reacción, donde el co-sustrato y una enzima secundaria son utilizados para llevar a cabo la regeneración oxidativa o reductiva del cofactor de nicotinamida (ver Figura 2). Este método ha sido el más implementado y es muy favorable si la segunda reacción enzimática es casi o totalmente irreversible. Los ejemplos más conocidos para la regeneración del NADH son las regeneraciones con formiato/formiato deshidrogenasa y glucosa/glucosa deshidrogenasa. El primero de los anteriores es el método de mayor aplicación y el primero en ser llevado a gran escala por Groger *et al.* (2012), y el segundo es uno de los métodos con alta actividad específica y puede usar tanto NAD⁺ como NADP⁺ (Hummel & Gröger, 2014) (Wu, Tian, Song, Liu, & Yang, 2013). Asimismo, se han reportado métodos para la regeneración enzimática del NAD⁺, donde algunos de los más conocidos y eficientes son catalizados por las enzimas glutamato deshidrogenasa y L-lactato deshidrogenasa, siendo esta última una enzima con

características deseables debido a su elevada actividad específica, disponibilidad comercial y bajo costo (Weckbecker, Gröger, & Hummel, 2010).

Figura 2. Principio de regeneración enzimática con co-sustrato y co-enzima.



Fuente: Tomado de Hummel & Gröger, 2014.

Existen otros dos principios para la regeneración enzimática: usando la misma enzima con un segundo sustrato y un sistema de lazo cerrado sin un co-sustrato externo (Hummel & Gröger, 2014).

1.2.1.2. Ventajas y desventajas: La regeneración enzimática es el método más empleado y tiene varias ventajas sobre los otros, siendo la más importante el gran número de ciclos (TON, Turnover Number) que pueden ser obtenidos debido a su alta selectividad (regio y estereoselectividad). No requiere mediadores pues el ion hidruro es transferido directamente en el sistema de regeneración enzimático, es

amigable ambientalmente, tiene alta compatibilidad con la reacción principal, puede darse a condiciones moderadas y el monitoreo del progreso de la reacción es relativamente fácil (Weckbecker, Gröger, & Hummel, 2010). Sin embargo, muchos de los procesos no pueden ser llevados a nivel industrial, pues el costo de obtención de algunas enzimas, tanto de fuentes naturales como por métodos de ingeniería, es muy alto y obtener el producto deseado puede ser difícil, en muchos casos, porque un eficiente sistema de separación debe ser agregado. Finalmente, debe garantizarse un buen sistema de acoplamiento y que la enzima de regeneración actúe más rápido que la enzima principal para suplir el cofactor requerido en la reacción, lo cual en algunas ocasiones no es sencillo de lograr (Wu, Tian, Song, Liu, & Yang, 2013).

1.2.2. Regeneración química Este método de regeneración es realizado por un reactivo redox con un potencial apropiado (Bartlett, 2008). Algunas sales inorgánicas (Nakamura, Aizawa, & Miyawaki, 1988), mediadores quinoides (Weckbecker, Gröger, & Hummel, 2010) y algunos tipos de complejos organometálicos han sido usados para ese propósito, siendo el último uno de los más prometedores y favorables (Wu, Tian, Song, Liu, & Yang, 2013).

1.2.2.1. Catalizadores de complejos organometálicos: Los compuestos orgánicos que contienen enlaces metal-carbono son llamados complejos organometálicos (Miessler, Fischer, & Tarr, 2014). Muchos de ellos, y especialmente aquellos que contienen metales de transición, han demostrado gran potencial en aplicaciones para la biología y la medicina (Betanzos Lara & Liu, 2012). También varios complejos organometálicos, principalmente complejos con iridio, rodio y rutenio, han sido estudiados y presentados como catalizadores apropiados en métodos para la regeneración de coenzimas debido por un lado, a su estabilidad, regioselectividad y capacidad para trabajar en condiciones moderadas,

características propicias para reacciones biológicas; y por otro lado, a los buenos resultados como catalizadores en reacciones de hidrogenación y deshidrogenación (Fukuzumi, Suenobu, & Maenaka, 2012).

Existe un amplio rango de complejos debido a la variedad de ligandos que pueden interactuar con el átomo metálico y a la cantidad de éstos, dando como resultado diferentes tipos de complejos con diferentes características. Algunos de los complejos organometálicos más prometedores y los más usados para la regeneración de cofactor son aquellos que tienen como alguno de sus ligandos al pentametilciclopentadienilo (Cp^*), un ligando muy estable y activo a diferentes condiciones de pH y temperatura, y también muy utilizado para la regeneración electroquímica y fotoquímica de las coenzimas (Wu, Tian, Song, Liu, & Yang, 2013).

Los compuestos como la 1, 10-fenantrolina y 2, 2'-bipiridimina, son ligandos quelantes multidentados muy usados en la síntesis de complejos organometálicos debido a su estabilidad térmica y en disolución (Moeller, 1994). Especialmente, la 1, 10-fenantrolina y sus derivados, son ligandos que debido a su estructura planar, rígida y aromática, son muy versátiles químicamente y tienen alta capacidad quelante (Accorsi, Listorti, Yoosaf, & Armaroli, 2009).

1.2.2.2. Ventajas y desventajas: Una de las principales ventajas de este método es que los complejos organometálicos actúan también como un cofactor (transportador de hidruros) sin requerir otra reacción. Además, estos complejos tienen alta estabilidad y muchos de ellos pueden llevar a cabo tanto reacciones de oxidación de NADH como reducción del NAD^+ . También, los métodos químicos generalmente tienen bajos costos en relación con los métodos enzimáticos.

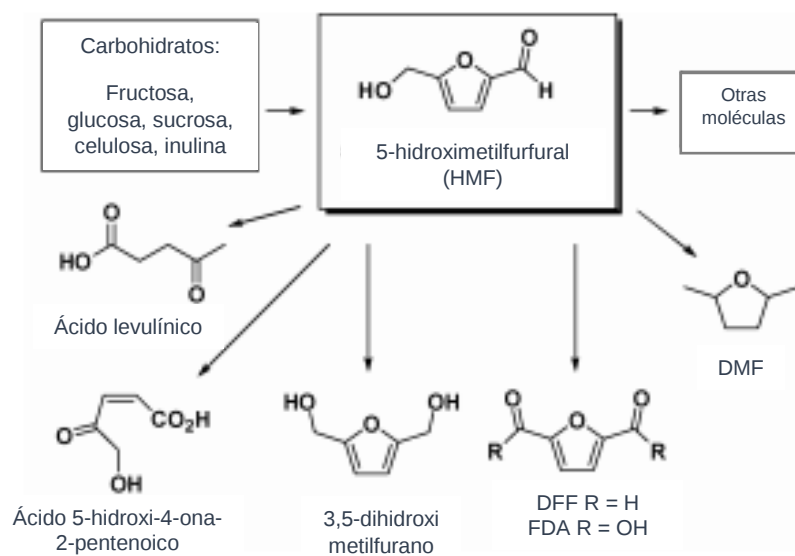
Varios complejos pueden realizar las regeneraciones de los cofactores regioselectivamente, sin embargo, los catalizadores químicos usualmente tienen baja selectividad y bajos TTN en comparación con los catalizadores enzimáticos. Existen también algunos problemas como la inactivación y contaminación de la enzima si algunas sales inorgánicas (e.g. ditionito de sodio y borohidruro de sodio) son usadas como agentes químicos reductores (Betanzos Lara & Liu, 2012), (Wu, Tian, Song, Liu, & Yang, 2013).

Debido a lo mencionado anteriormente y al hecho de que diversos complejos organometálicos pueden ser sintetizados, se pueden obtener distintos catalizadores con alto potencial, aunque es necesario precisar que aún deben ser realizados muchos estudios e investigaciones.

1.3. REACCIÓN DE INTERÉS

La regeneración de los cofactores enzimáticos, es muy importante para permitir que varias reacciones e incluso procesos enteros puedan ser desarrollados de una manera viable. Una de sus aplicaciones es la optimización de algunas reacciones lineales involucradas en la producción de moléculas o intermediarios clave, para obtener distintos productos como alternativa a aquellos que son derivados del petróleo. La HMF (5-hidroximetilfurfural) es una de esas moléculas clave, es posible producirla a partir de carbohidratos, especialmente, de la glucosa y de la fructosa en un solo paso, y sirve como precursora de diferentes compuestos (Figura 3) empleados en la producción de polímeros, fármacos, combustibles, entre otros, debido a la diversidad de sus funciones químicas (Rosatella, Simeonov, Frade, & Afonso, 2011).

Figura 3. Compuestos base para la producción de HMF y sus derivados.



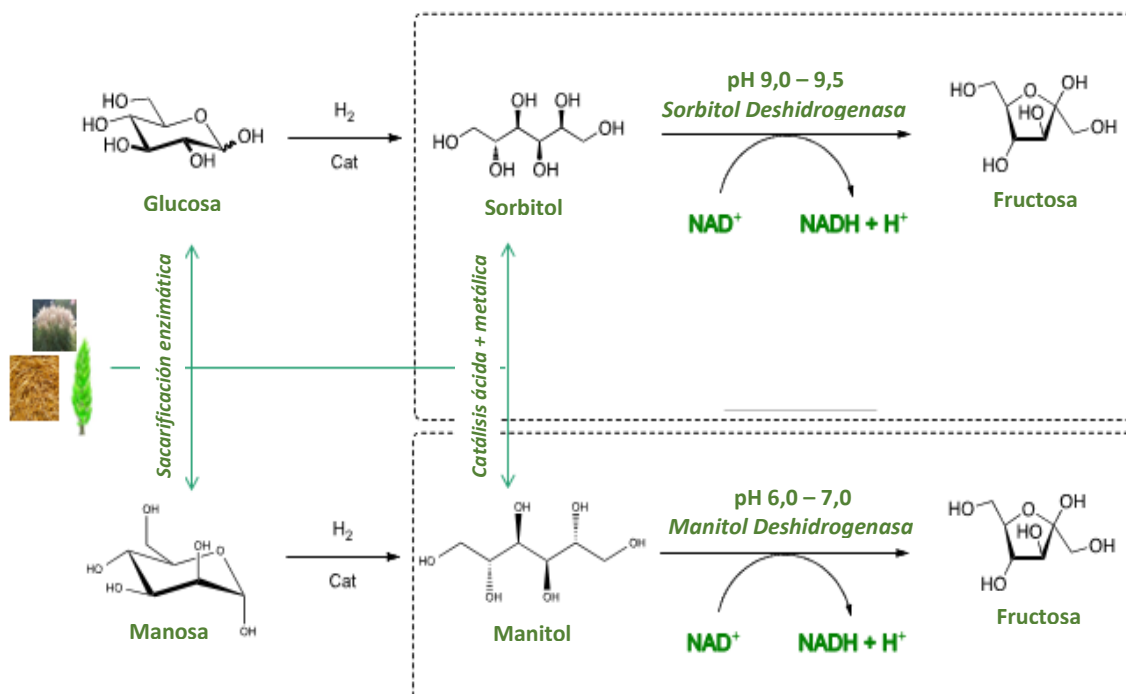
Fuente: Tomado de Rosatella, Simeonov, Frade, & Afonso, 2011.

En los estudios realizados, la deshidratación de la fructosa es el proceso que permite obtener los más altos rendimientos en la producción de HMF. En el caso de la glucosa, la producción directa de HMF cuenta con muy bajas velocidades de conversión y selectividad, sin embargo, es ésta la materia prima más abundante obtenida de la hidrólisis de la biomasa. Esto ha hecho necesaria la búsqueda de alternativas que permitan incrementar la producción de HMF a partir de glucosa, siendo una de éstas la integración de la isomerización de la glucosa a fructosa y su posterior deshidratación. No obstante, dicha integración ha tenido algunos inconvenientes pues los métodos tradicionales de isomerización, que incluyen catalizadores básicos o enzimas, se ven afectados por las fuertes condiciones ácidas que implica la deshidratación de la fructosa. Nuevas alternativas como la utilización de catalizadores de ácido de Lewis en líquidos iónicos, aunque son las más prometedoras y se han obtenido muy buenos resultados, pueden presentar

desactivación frente a pequeñas cantidades de agua y son de alto costo (Wang, 2014), (Pagán Torres, Wang, Gallo, Shanks, & Dumesic, 2012).

Como alternativa a lo anterior, otras reacciones enzimáticas pueden llevarse a cabo para este propósito. Las dos rutas propuestas por el equipo de laboratorio (Figura 4) incluyen que la glucosa y la manosa, producto de la sacarificación enzimática de la biomasa, sean sometidas a una reacción de hidrólisis ácida para obtener sorbitol y manitol, respectivamente, y posteriormente, mediante una reacción catalizada enzimáticamente por sus respectivas enzimas, sorbitol deshidrogenasa y manitol deshidrogenasa, poder obtener fructosa. Sin embargo, aplicar estas rutas a gran escala no será posible si no se logra la regeneración del cofactor NADH.

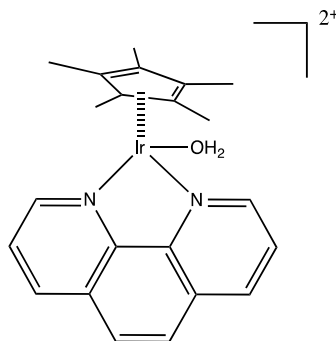
Figura 4. Mecanismos de reacción para la producción de fructosa.



Fuente: Tomado de Guehl, M., 2015.

Por esta razón, diferentes métodos de regeneración han sido propuestos, no obstante se presenta la catálisis híbrida como una opción favorable, pues cuenta con las ventajas de usar complejos organometálicos en una reacción catalizada enzimáticamente. El concepto de catálisis híbrida fue validado por el equipo Valbio de la UCCS (Unité de Catalyse et du Chimie Solide, Université de Lille 1), el cual empleó el complejo organoiridio $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{fenantrolina})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (Figura 5) para la regeneración del cofactor NAD^+ en la reacción que produce fructosa a partir de sorbitol, obteniendo una conversión del 4%. Este trabajo fue presentado para patente en enero del 2015 (FR15/50.532).

Figura 5. Estructura del complejo $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{fenantrolina})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$.



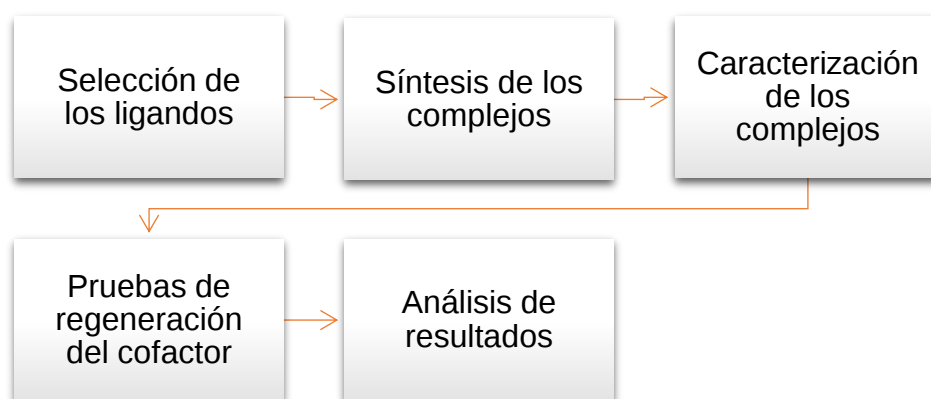
Fuente: Tomado de Guehl, M., 2015.

El mecanismo de reacción propuesto por el equipo (ver Anexo A) se basó en la investigación de Betanzos-Lara *et al.* (2012). En este mecanismo la reacción de regeneración ocurre al mismo tiempo que la reacción enzimática mediante el complejo $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{fenantrolina})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, el cual actúa como un transportador de hidrógenos, pues capta el hidruro del cofactor NADH y luego lo libera, produciendo el cofactor en su forma oxidada (NAD^+), necesario para la reacción enzimática, e hidrógeno molecular (H_2).

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología implementada en este trabajo se encuentra esquematizada a continuación en la Figura 6.

Figura 6. Metodología de investigación



2.1. MATERIALES Y REACTIVOS

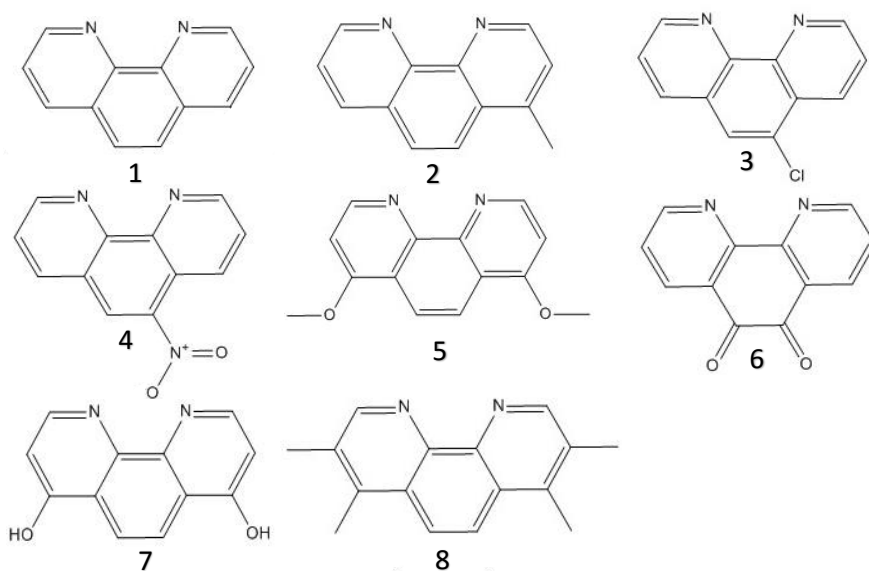
Para el desarrollo de la presente investigación se empleó el dímero de dicloropentametilciclopentadienil Iridio(III) $[\text{IrCp}^*\text{Cl}_2]_2$ (Sigma), ocho ligandos derivados de la fenantrolina (ver Figura 7) que son: 1,10- fenantrolina ($\geq 99\%$, Aldrich), 4-metil-1,10- fenantrolina (97%, Sigma Aldrich), 5-cloro-1,10- fenantrolina (98%, Aldrich), 5-nitro-1,10- fenantrolina ($\geq 97\%$, Sigma), 4,7-dimetoxi-1,10- fenantrolina ($\geq 97\%$, Aldrich), 1,10- fenantrolina-5,6-diona (97%, Aldrich), 4,7-dihidroxi-1,10- fenantrolina (30% contenido de colorante, Aldrich) y 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina ($\geq 98\%$, Aldrich). También se empleó β -nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+ , $\geq 95\%$) y β -nicoticamida adenina dinucleótido reducida

(NADH, $\geq 97\%$) adquiridos de Sigma, metanol ($\geq 99.9\%$, Sigma Aldrich), dietiléter (Panreac), nitrato de plata (99.9%, Alfa Products) y acetato de estroncio ($\sim 3\%$ agua, Aldrich). Se emplearon como solventes agua (D_2O , 99.96%D) y diclorometano (CD_2Cl_2 , 99.9%D) deuterados, y dimetil sulfóxido (DMSO, 99.9%), obtenidos de euriso-top. Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada Milli-Q.

2.2. SELECCIÓN DE LOS LIGANDOS

Teniendo como base al complejo $[Cp^*Ir(\text{fenantrolina})(H_2O)]^{2+}$, siete ligandos derivados de la fenantrolina fueron seleccionados. Dichos ligandos poseen grupos sustituyentes tanto dadores como aceptores de electrones y en diferentes posiciones de los anillos aromáticos de la fenantrolina, generando efectos inductivos o de resonancia, ya sean fuertes o débiles, cambiando el ambiente electrónico alrededor del Iridio y afectando la reacción de regeneración del cofactor.

Figura 7. Ligandos de los diferentes complejos a sintetizar



2.3. SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS

Inicialmente, en una cabina de argón, se agregan 100 mg del precursor $[\text{IrCp}^*\text{Cl}_2]_2$ y la cantidad estequiométrica correspondiente a cada ligando a un tubo schlenk estándar, el cual se sella muy bien y se extrae de la cabina. En una plancha de calentamiento, agitando a 600 rpm, se agregan a los reactivos 10 mL de metanol, rápidamente, y la solución formada se deja bajo reflujo durante 10 horas. Cuando la mezcla alcanza la temperatura ambiente, se agregan 5 mL de una solución de nitrato de plata que contiene 1.98 equivalentes de reactivo. La mezcla obtenida se deja en agitación a 600 rpm, en ausencia de luz durante 3 horas. Luego, se filtra dos veces, con algodón y con un filtro PTFE de 0.2 μm . El filtrado se agrega a otro tubo schlenk y se somete a una evaporación al vacío hasta obtener un polvo con coloración amarilla o anaranjada, el cual, es recrystalizado en metanol/dietiléter de 12 a 20 horas. Finalmente, los cristales obtenidos se filtran por gravedad y se llevan a evaporación al vacío durante 2 horas para garantizar que los complejos estén libres de solvente.

2.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS

Para la caracterización, los complejos obtenidos y sus respectivos ligandos se analizaron mediante RMN ^1H (Resonancia Magnética Nuclear de protones) en un espectrómetro Bruker Avance 300 MHz a 300 K y el procesamiento de los datos se llevó a cabo mediante el software de Bruker TopSpin[®]. La técnica de caracterización de RMN permite determinar si el complejo deseado ha sido sintetizado correctamente o no, teniendo en cuenta en el espectro los desplazamientos, la forma de los picos y su integración, y haciendo la comparación con el espectro del ligando correspondiente. Los espectros obtenidos se encuentran en el Anexo B.

En las pruebas realizadas, los solventes utilizados fueron agua y diclorometano deuterados (D_2O y CD_2Cl_2 , respectivamente), y todos los ligandos y complejos obtenidos se disolvieron en al menos uno de los dos solventes a excepción del ligando 7, la 4,7-dihidroxi-1,10-fenantrolina.

2.5. PRUEBA DE REGENERACIÓN DEL COFACTOR

Para analizar el efecto de los complejos en la regeneración del cofactor en relación a los diferentes ligandos, se realizan las pruebas mediante RMN 1H , empleando un espectrómetro Bruker de 400 MHz. En primera instancia, se calibra la temperatura, con el fin de establecerla en 310 K, usando como referencia una solución de 80% glicol en DMSO, en un tubo de 5 mm. Luego, se obtiene un espectro tanto del complejo como del NADH, ambos con una referencia externa de acetato de estroncio 58 mM para los complejos 3 y 4, y 2 mM para el resto de complejos, con el fin de asegurar que las concentraciones empleadas son correctas y detectables. Finalmente, se adquieren los espectros de una solución que contiene 15 mM de NADH con 1 mM del complejo sintetizado, a los 5, 10, 20 y 30 minutos, y después de éste, cada 30 minutos durante 2 horas y media. Los espectros obtenidos se muestran en el Anexo D.

Con el fin de determinar los resultados obtenidos, se escogen ciertas señales en los espectros, que pueden ser una o dos de cada compuesto, fáciles de diferenciar y que no se superpongan con otras, con el fin de obtener un valor apropiado y correcto en la integración. Las señales escogidas, con sus correspondientes desplazamientos se encuentran en el Anexo C.

Una vez se hallan las integrales de las señales elegidas, y conociendo la concentración de la referencia, se pueden obtener valores que están relacionados con las concentraciones de los diferentes compuestos. Con lo anterior, se calculan las concentraciones del hidruro-complejo y del complejo sintetizado, los valores promedio del NADH y del NAD⁺, el NAD⁺ producido y de los productos de descomposición, así como el número de ciclos (TON) y la frecuencia del ciclo (TOF). Dichos cálculos se muestran en el Anexo E.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS

Se obtuvieron complejos con tonalidad amarilla (Figura 8), a excepción del complejo que se esperaba obtener con el ligando 7 (4,7-dihidroxi-1,10-fenantrolina) el cual no fue posible sintetizar, puesto que el ligando fue poco soluble en metanol y además los sustituyentes hidroxilo pueden formar dímeros a través de puentes de hidrógeno, generando agregados y/o especies complejas inactivas. Los rendimientos obtenidos en la síntesis se muestran en la Tabla 1.

Figura 8. Complejos organoiridio sintetizados



Tabla 1. Rendimientos de los complejos sintetizados

Complejo	Rendimiento [% peso]
1	58,9
2	66,4
3	40,0

Complejo	Rendimiento [% peso]
4	42,9
5	28,4
6	15,4
7	0,0
8	75,5

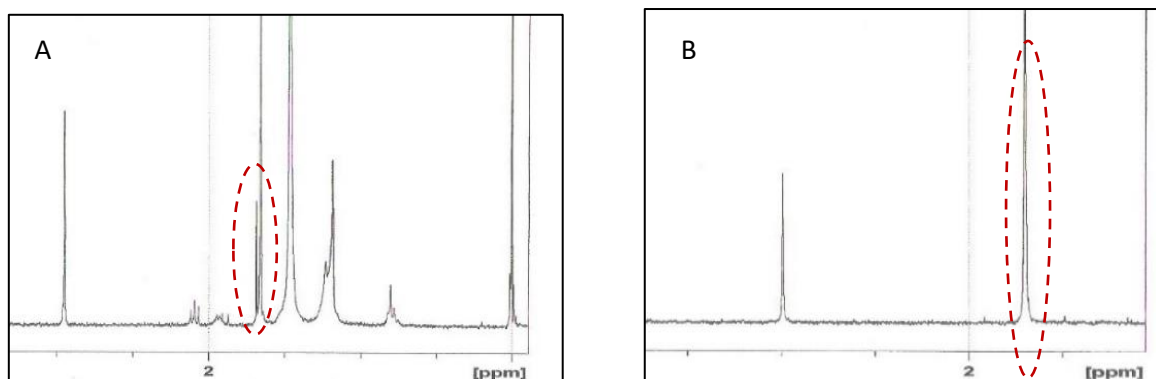
Para los complejos 5 y 6, probablemente el dietiléter no es el solvente más adecuado, pues el proceso de recristalización en metanol/dietiléter no fue muy bueno, y esto pudo haber causado que los rendimientos obtenidos hayan sido muy bajos.

3.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS

Todos los complejos sintetizados fueron solubles en D₂O, lo cual es muy importante pues la regeneración del cofactor, el sistema de interés, se lleva a cabo en medio acuoso. Además, con base en los espectros RMN ¹H obtenidos de cada ligando y el complejo sintetizado (ver Anexo B), se puede observar que los picos correspondientes a los protones de los ligandos de estudio son desplazados hacia campo débil, lo cual muestra el efecto atractor que tiene el ligando Cp* cuando el complejo es formado. Por otra parte, para los ligandos 2, 4, 5 y 6 se encontró un solapamiento de dos bandas en el desplazamiento donde debía aparecer sólo el singlete del Cp*, lo cual indica que probablemente una cierta cantidad de precursor quedó sin reaccionar. Por tanto, se realizó nuevamente la recristalización para cada uno de los complejos, obteniendo así los resultados esperados, a excepción del complejo con el ligando 6, el cual siguió presentando ese comportamiento,

reflejando que el complejo no es puro. El complejo 6 no fue utilizado en las pruebas de regeneración. (En la Figura 9 se muestra un ejemplo ilustrativo).

Figura 9. Espectros de RMN ^1H del complejo 2. (A) Espectro después de la síntesis donde la señal del Cp* presenta el solapamiento de dos bandas. (B) Espectro después de recristalizar, presentando un singlete definido en la señal del Cp*.

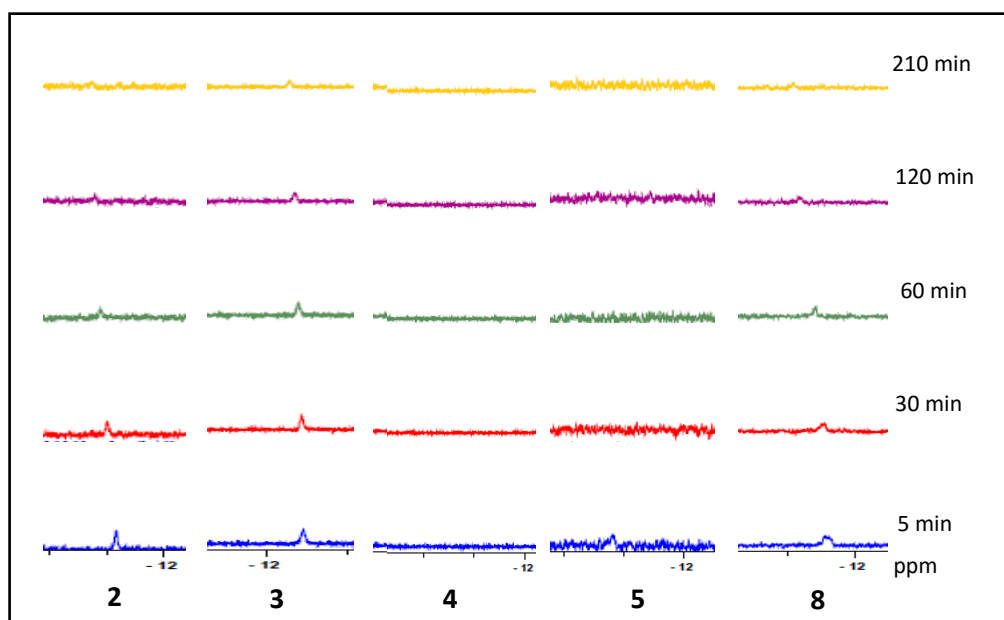


3.3. PRUEBA DE REGENERACIÓN DEL COFACTOR

De los espectros obtenidos se puede observar que, a partir de los 5 minutos de reacción, aparecen las señales correspondientes al cofactor NAD^+ y, en la parte negativa, un pico de baja intensidad atribuido al hidruro del hidruro-complejo (un intermedio en la reacción de regeneración), lo cual puede representar una rápida transferencia del hidruro y que efectivamente ocurre la reacción de regeneración. Además, de manera general para los 5 complejos, se aprecia con relación al hidruro, que la intensidad de su señal disminuye a medida que la reacción avanza (Figura 10), lo cual es similar a los resultados del hidruro-complejo obtenidos por Betanzos-Lara *et al.* (2012) y puede sustentar el mecanismo propuesto pues, la disminución del hidruro-complejo concuerda con la protonación de éste para que la reacción

continúe con la formación de H_2 y la regeneración del complejo. Para los complejos 2, 3, 5 y 8, la señal del hidruro disminuye hasta llegar a cero, ocurriendo rápidamente para el complejo 5 (a los 10 minutos) y para los complejos 2, 8 y 3, el pico desaparece a los 90, 120 y 382 minutos, respectivamente. Por otro lado, para el complejo 4 no se observa esta señal, lo cual podría suponer una rápida reacción y descomposición del hidruro-complejo, aunque no se puede determinar con certeza dicho comportamiento.

Figura 10. Espectros de RMN de los complejos con ligandos 2, 3, 4, 5 y 8, en la región del hidruro-complejo, a los 5, 30, 60, 120 y 210 minutos de reacción.



3.3.1. Actividad de los complejos El número de ciclos (TON, por sus siglas en inglés Turnover Number) y la frecuencia de ciclo (TOF, por sus siglas en inglés Turnover Frequency) son una medida de la actividad de los complejos. Los resultados de dichos cálculos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. TON y TOF para cada uno de los complejos sintetizados

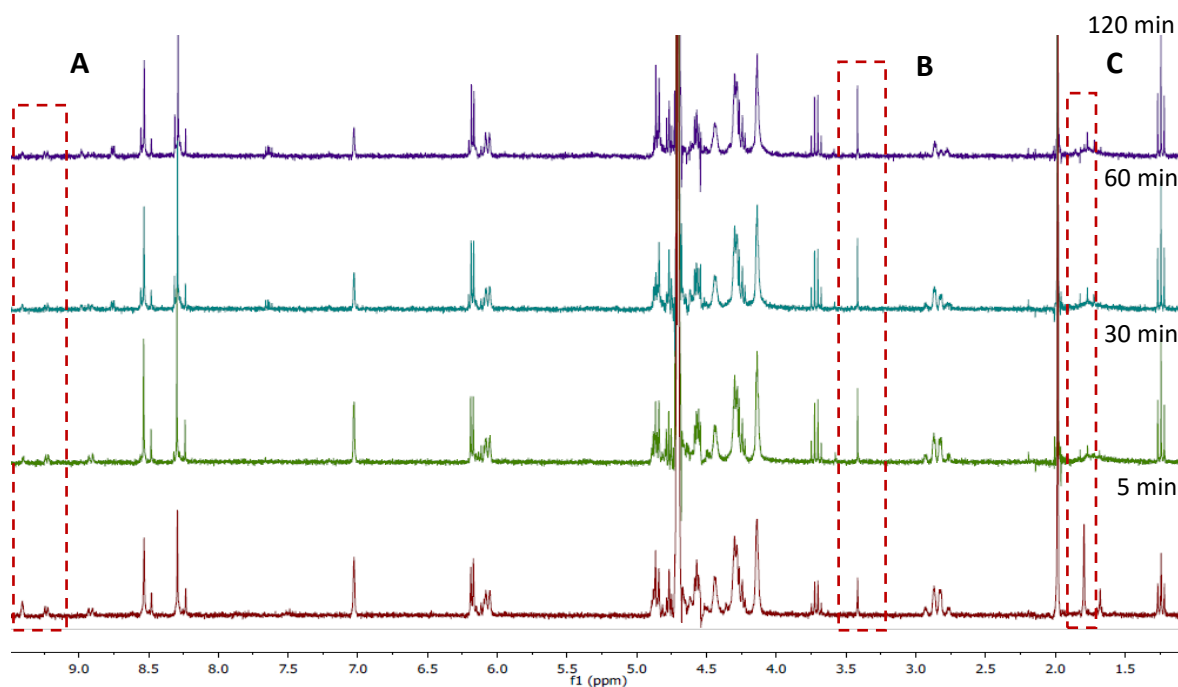
Complejo	TON	TOF [h ⁻¹]
2	1,16	4,08
3	1,26	10,24
4	1,92	12,97
5	0,69	3,98
8	0,64	4,18

Se puede observar que el número de ciclos para los complejos 2, 3 y 4 es mayor a un mol de NAD⁺ por mol de complejo organoiridio, indicando que el complejo sí actúa como catalizador y puede ser reciclado según el mecanismo propuesto. Por otro lado, los complejos 3 y 4 son los de actividad más rápida, al presentar los valores más elevados del TOF. Los complejos con la actividad más baja son los complejos 5 y 8. El mayor número de ciclos se alcanza con el complejo 4, un complejo cuyo ligando tiene un grupo atractor muy fuerte, por tanto, este tipo de ligandos son los más adecuados para obtener complejos con mayor actividad catalítica.

3.3.2. Selectividad de los complejos Una de las características más importantes de un catalizador es su selectividad, pues a pesar de que éste tenga un valor alto de conversión, si no es selectivo no es adecuada ni eficiente su utilización. Para el complejo 4, a pesar de haber sido el complejo con los mayores valores de TON y TOF, el análisis de los espectros obtenidos permite concluir que éste es el complejo menos selectivo pues, a partir de los 60 minutos no se observan las señales del cofactor NAD⁺, aparece desde el primer espectro una señal desconocida y a partir de los 30 minutos no se vuelve a observar una señal clara del complejo (Figura 11).

Probablemente este complejo, el cual posee un ligando con un grupo fuertemente atractor como lo es el NO₂, es muy reactivo y pudo haber atacado al mismo tiempo al NAD⁺ y al complejo, generando reacciones secundarias.

Figura 11. Espectro RMN ¹H del complejo 4 presentando (A) la descomposición del NAD⁺ desde los 60 minutos, (B) aparición de una señal desconocida y (C) descomposición del complejo a partir de los 30 minutos de reacción.

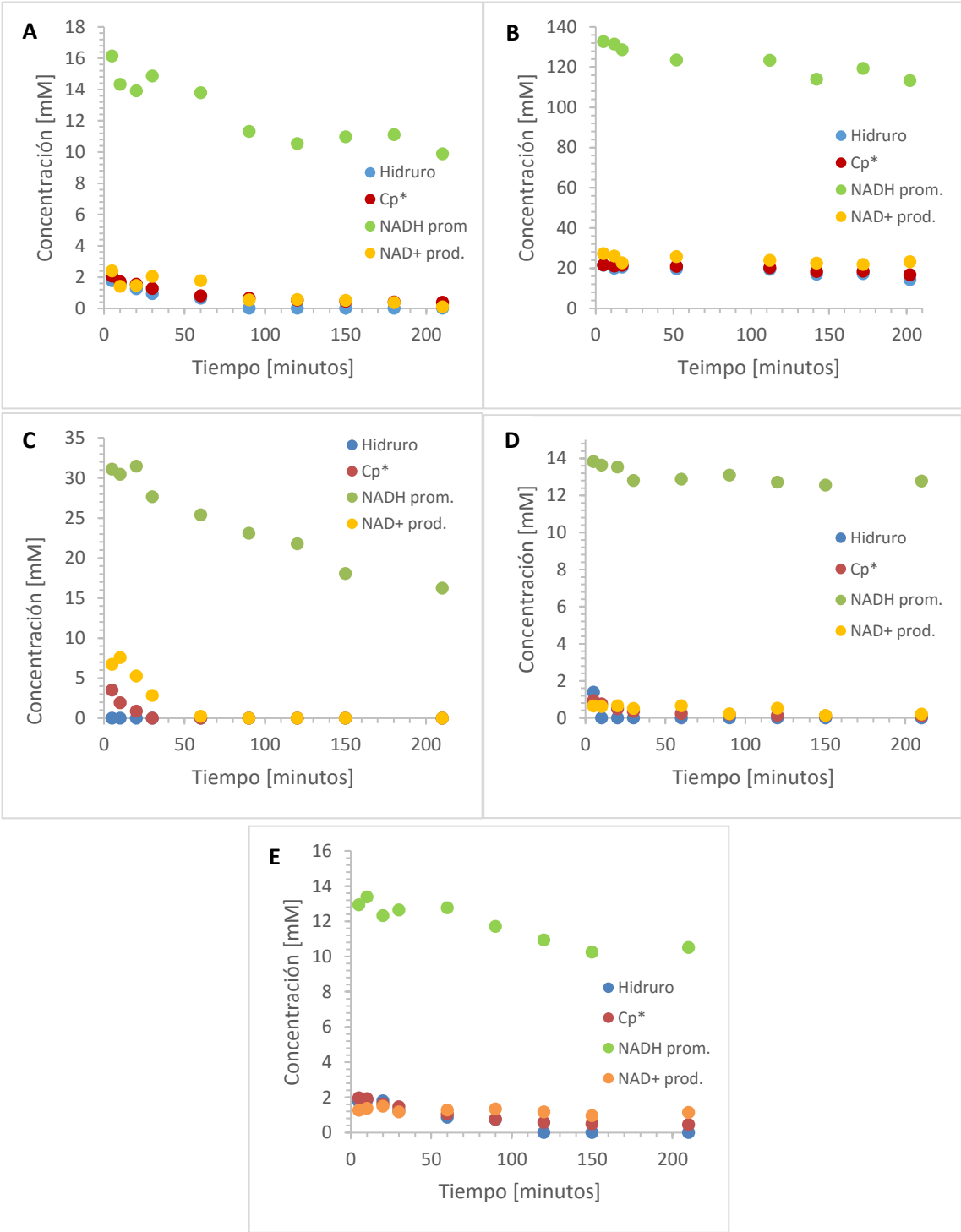


Las gráficas de las concentraciones de cada una de las especies en función del tiempo, para cada uno de los complejos, se presentan en la Figura 12. Los espectros de los complejos 2, 3, 5 y 8 no reflejan señales de descomposición de los cofactores tan notorias como en el caso del complejo 4, no obstante, como se puede observar en la Figura 12, la concentración de NAD⁺ producido no aumenta progresivamente,

como se esperaría si los complejos fueran completamente selectivos, sino que aumenta un poco y luego decrece hasta que tiende a mantenerse estable, a partir de los 90 minutos aproximadamente. Por otro lado, para los cinco complejos, la concentración del NADH promedio tiende a disminuir un poco y luego a mantenerse constante, siendo los complejos 3 y 5 los más rápidos en estabilizarse (a partir de los 50 minutos).

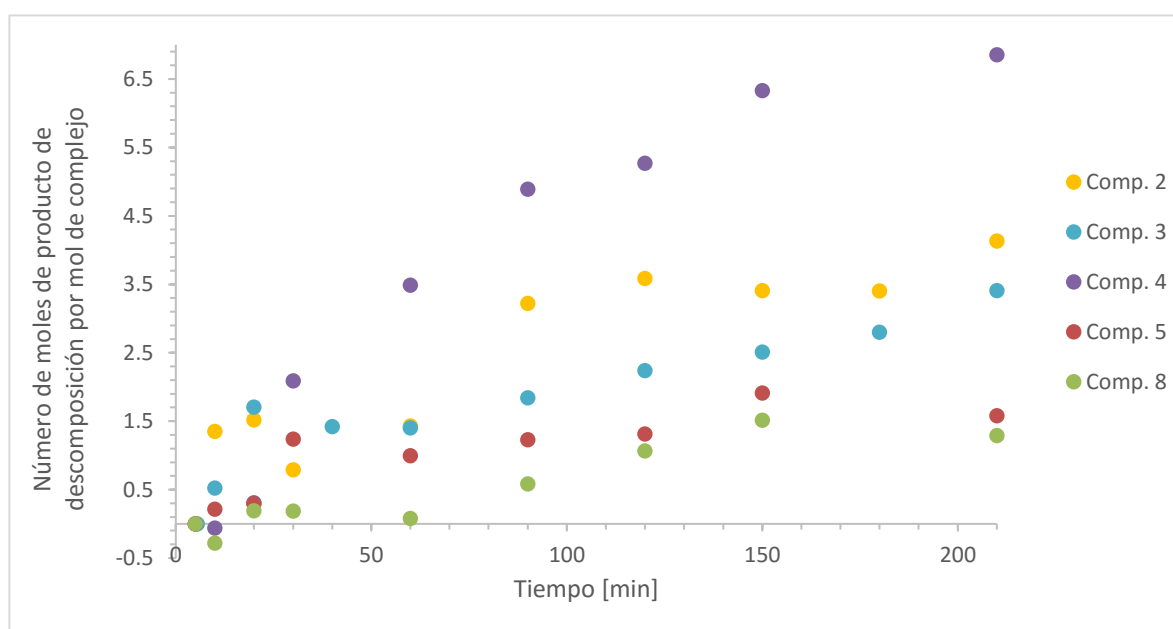
Los comportamientos de la concentración de NAD^+ producido y del NADH promedio reflejan que los complejos no son muy selectivos y que tanto el NADH como el NAD^+ generan productos de descomposición. Otra razón que puede explicar esa tendencia, especialmente la estabilización de las concentraciones, es que durante la reacción se llega a un punto donde el complejo no cuenta con suficientes protones en el medio y por tanto no se puede llevar a cabo el ciclo de regeneración.

Figura 12. Dependencia de la concentración en relación al tiempo de las especies observadas durante la reacción de regeneración, correspondientes a los complejos (A) 2, (B) 3, (C) 4, (D) 5 y (E) 8.



Los resultados obtenidos del cálculo de producto de descomposición (ver Anexo E) se muestran en la Figura 13, siendo éstos, una medida de la selectividad de cada complejo.

Figura 13. Medida de la selectividad con base a la concentración de productos de descomposición.



En la figura 13 se puede observar que para los complejos 2 y 3, la concentración de productos de descomposición aumentó rápidamente en los primeros 20 minutos, posteriormente disminuyó un poco y luego continuó aumentando con el paso del tiempo. Los complejos 5 y 4 muestran resultados favorables en los primeros minutos pero después aumentan la concentración de productos de descomposición, siendo este último el que presenta mayor aumento y por consiguiente, el menos selectivo de los complejos sintetizados, probablemente debido a la gran reactividad que tiene el grupo nitro como sustituyente en la fenantrolina. De acuerdo a lo anterior se

puede concluir que la selectividad es mejor en complejos cuyos ligandos tienen grupos dadores de electrones o activantes fuertes, y ésta incrementa en el siguiente orden: $8 > 5 > 3 > 2 > 4$, siendo los complejos 8 y 5 los que generan menor cantidad de producto de descomposición y los más estables durante la reacción de regeneración.

Finalmente, con base a los resultados descritos, el complejo con el ligando 3 (5-cloro-1,10-fenantrolina) presenta las mejores características entre los complejos sintetizados pues, puede actuar como catalizador en la regeneración del cofactor NAD^+ , con un alto valor de TON (1,26) y de TOF ($10,24 \text{ h}^{-1}$), y una selectividad considerable; y se concluye que grupos atractores débiles, pueden ser empleados como catalizadores para la regeneración. En términos de actividad catalítica y rapidez, los resultados concuerdan con las predicciones basadas en la polarización de la distribución electrónica, las cuales señalan a los grupos atractores en la fenantrolina como los más apropiados para llevar a cabo la oxidación del cofactor NADH ; sin embargo, no ocurre lo mismo al evaluar la selectividad de los complejos, pues aquellos que cuentan con grupos dadores fuertes, son los que destacan en esta característica tan importante para un catalizador.

4. CONCLUSIONES

- Las variantes en el ligando pueden conferir diferentes características al complejo que influyan en la distribución electrónica del iridio, lo cual implica variabilidad en la actividad que puede presentar el complejo frente al proceso de oxidación del cofactor NAD⁺.
- La síntesis fue apropiada pues se lograron sintetizar siete complejos con ligandos de reactividad diferentes y coordinando correctamente los ligandos al metal mediante una misma ruta sintética, sin embargo esto influyó en la obtención de bajos porcentajes de rendimiento.
- Se produce una rápida transferencia del hidruro y efectivamente ocurre la reacción de regeneración, pues el espectro RMN muestra las señales del hidruro y del NAD⁺ a partir de los 5 minutos de reacción.
- Las características de los catalizadores se ven afectadas positivamente por diferentes efectos electrónicos, ya que la actividad catalítica y la rapidez de la reacción aumentan con la presencia de grupos atractores de electrones, pero la selectividad mejora con los grupos dadores de electrones.
- El complejo con el ligando 3 (5-cloro-1,10-fenantrolina) presenta las mejores características pues, puede actuar como catalizador en la regeneración del cofactor NAD⁺, con un alto valor de TOF (10.24 h⁻¹) y una selectividad considerable.

RECOMENDACIONES

- Continuar con las pruebas para la producción de fructosa, utilizando el complejo con los ligandos 1,10-fenantrolina y 5-cloro-1,10-fenantrolina para determinar si realmente actúan como catalizadores en el sistema híbrido.
- Realizar la regeneración del cofactor NAD⁺ empleando los complejos con ligandos 4-cloro-1,10-fenantrolina, 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 5,6-dicloro-1,10-fenantrolina, para determinar si alguna de estas variantes puede aumentar la selectividad del complejo.
- Hacer la síntesis de complejos cuyos ligandos posean sustituyentes desactivadores fuertes y débiles, con el fin de analizar, cuáles de estos grupos pueden aumentar la selectividad del complejo en la reacción de regeneración, en vista a lo ocurrido con la 5-nitro-1,10-fenantrolina.
- Investigar si es posible la síntesis del complejo 5-cloro-3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina para realizar la regeneración del cofactor NAD⁺ empleando este complejo y analizar el efecto que se produce al mezclar ambos tipos de grupos en la fenantrolina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCORSI, G.; LISTORTI, A.; YOOSAF, K., y ARMAROLI, N. 1, 10-Phenanthrolines: versatile building blocks for luminescent molecules, materials and metal complexes. Chemical Society Reviews. Marzo, 2009. vol 38, no. 6, p. 1690-1700.

AIST, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. Spectral Database for Organic Compounds, SDBS. Jappon. [Base de datos en línea]. [Citado el 5 de julio de 2016]. Disponible en: <http://sdbb.db.aist.go.jp>.

BARTLETT, P. N. Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2008, p. 53. ISBN 978-0470-843642

BETANZOS LARA, S., y LIU, Z. Organometallic Ruthenium and Iridium Transfer-Hydrogenation Catalysis Using Coenzyme NADH as a Cofactor. Angewandte Chemie, International Edition. 2012. vol. 51, p. 3897-3900.

BRODERICK, Joan B. Coenzymes and Cofactors. Encyclopedia of Life Sciences. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2011, p. 1-11.

DUMEIGNIL, F. Hailing the hybrid. Public Service Review, European Union. 2011. no. 22, p. 528.

FUKUZUMI, S.; SUENOBU, T., y MAENAKA, Y. Efficient Catalytic Interconversion between NADH and NAD⁺ Accompanied by Generation and Consumption of Hydrogen with a Water-Soluble Iridium Complex at Ambient Pressure and Temperature. *Journal of the American Chemical Society*. 2012. vol. 134, no. 1, p. 367-374.

GUEHL, Marie. New concept of hybrid catalysis for biomass transformation [diapositivas]. Lille, 2015, 22 diapositivas, color.

HMDB, The Human Metabolome Database. Versión 3.6. [Base de datos en línea]. [Citado el 6 de julio de 2016]. Disponible en: <http://www.hmdb.ca>

HUMMEL, Werner. y GRÖGER, Harald. Strategies for regeneration of nicotinamide coenzymes emphasizing self-sufficient closed-loop recycling systems. *Journal of Biotechnology*. 2014. vol. 191, p. 22-31.

MIESSLER, Gary L.; FISCHER, Paul J. y TARR, Donald A. *Inorganic Chemistry*. 5 ed. Pearson, 2014, p. 475-529. ISBN-13: 978-0-321-81105-9.

MOELLER, Therald. *Química inorgánica*. Barcelona: Reverté S.A., 1994. p. 385-489. ISBN: 84-291-7391-9.

NAKAMURA, K.; AIZAWA, M. y MIYAWAKI, O. (1988). Electro-enzymology Coenzyme Regeneration. Berlin: Springer-Verlag, 1988, p. 87- . ISBN -13 : 978-3-642-73126-6.

PAGÁN TORRES, Y. J.; WANG, T.; Gallo, J. M.; Shanks, B. H. y Dumesic, J. A. Production of 5-Hydroxymethylfurfural from glucose using a combination of Lewis and Brønsted acid catalysts in water in a biphasic reactor with an alkylphenol solvent. American Chemical Society, Catalysis. 2012. vol. 2, no. 6, p. 930-934.

ROSATELLA, Andreia A.; SIMEONOV, Svilen P.; FRADE, Raquel F., y AFONSO, Carlos A. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) as a building block platform: Biological properties, synthesis and synthetic applications. Green Chemistry. 2011. vol. 13, no. 4, p. 754-793.

WANG, Tianfu. Catalytic conversion of glucose to 5-hydroxymethylfurfural as a potential biorenewable platform chemical. Graduate Theses and Dissertations, Iowa State University. Ames. 2014. 13721 p.

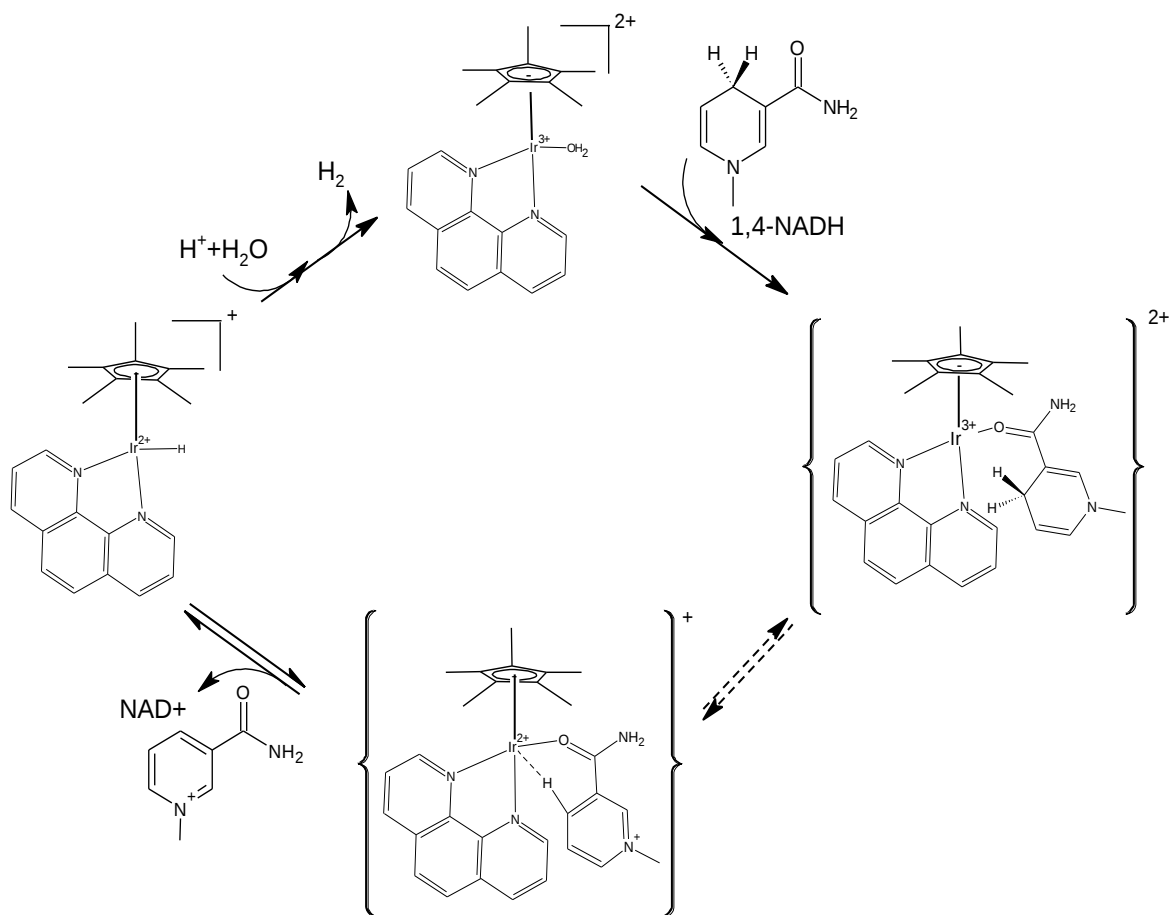
WECKBECKER, Andrea; GRÖGER, Harald y HUMMEL, Werner. Regeneration of Nicotinamide Coenzymes: Principles and Applications for the Synthesis of Chiral Compounds. *Biosystems Engineering I: Creating Superior Biocatalysts. Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology*. Wittmann C, Krull WR, 2010, vol. 120, p. 195-242.

WU, H.; TIAN, C.; SONG, X.; LIU, C.; YANG, D. y JIANG, Z. Methods for the regeneration of nicotinamide coenzymes. Green Chemistry. 2013. vol. 15, no. 7, p. 1773-1789.

ANEXOS

ANEXO A. MECANISMO DE REACCIÓN PROPUESTO PARA LA REGENERACIÓN DEL COFACTOR NAD⁺

Figura 14. Mecanismo propuesto para la regeneración del cofactor NAD⁺ mediante el complejo organoiridio [Cp*Ir(fenantrolina)(H₂O)]²⁺. Tomado de Betanzos-Lara *et al.* (2012).



ANEXO B. ESPECTROS RMN ^1H DE LOS LIGANDOS CON SUS RESPECTIVOS COMPLEJOS SINTETIZADOS

Figura 15. (A) Espectro RMN ^1H del ligando 2 (4-metil-1,10- fenantrolina) en CD_2Cl_2 .
(B) Espectro RMN ^1H del complejo sintetizado con el ligando 2 en D_2O .

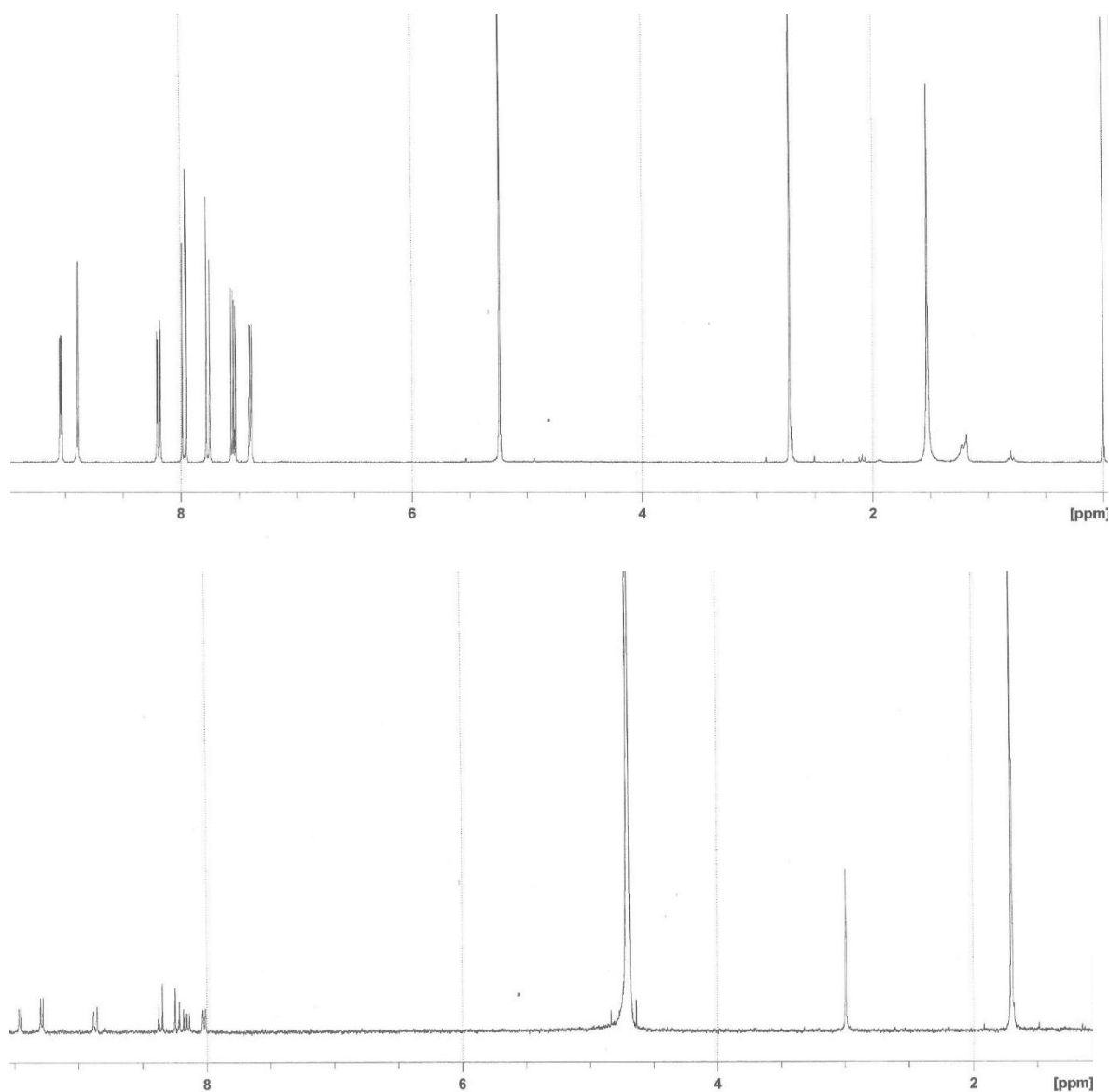


Figura 16. (A) Espectro RMN ^1H del ligando 3 (5-cloro-1,10- fenantrolina) en CD_2Cl_2 .
(B) Espectro RMN ^1H del complejo sintetizado con el ligando 3 en D_2O .

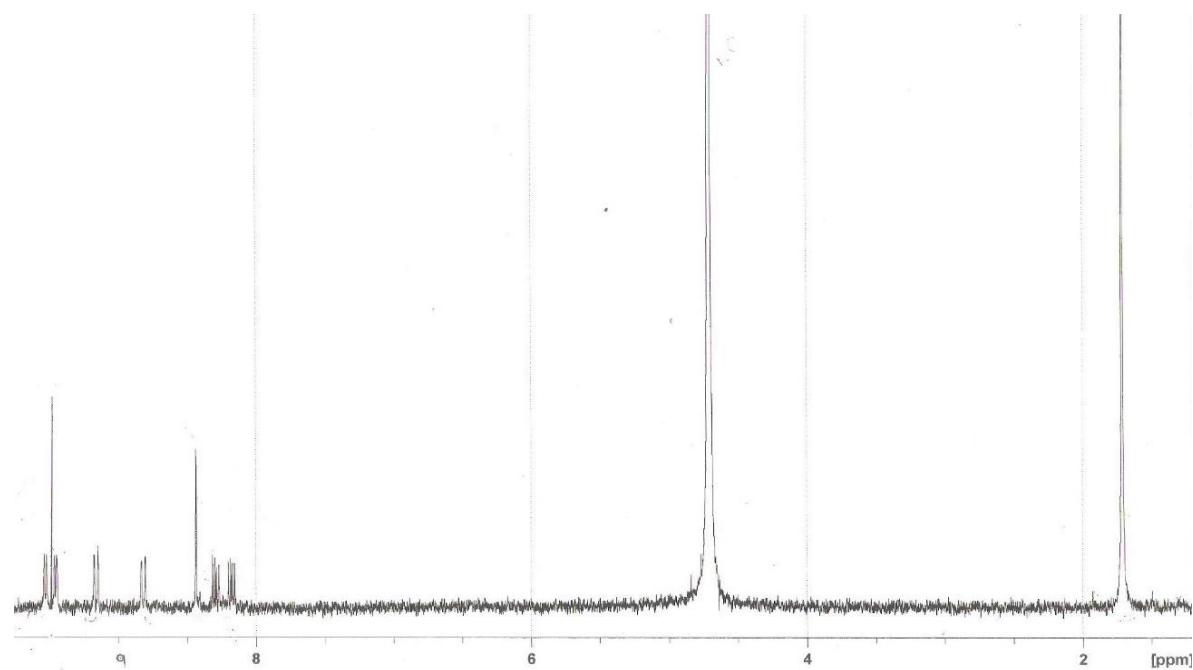
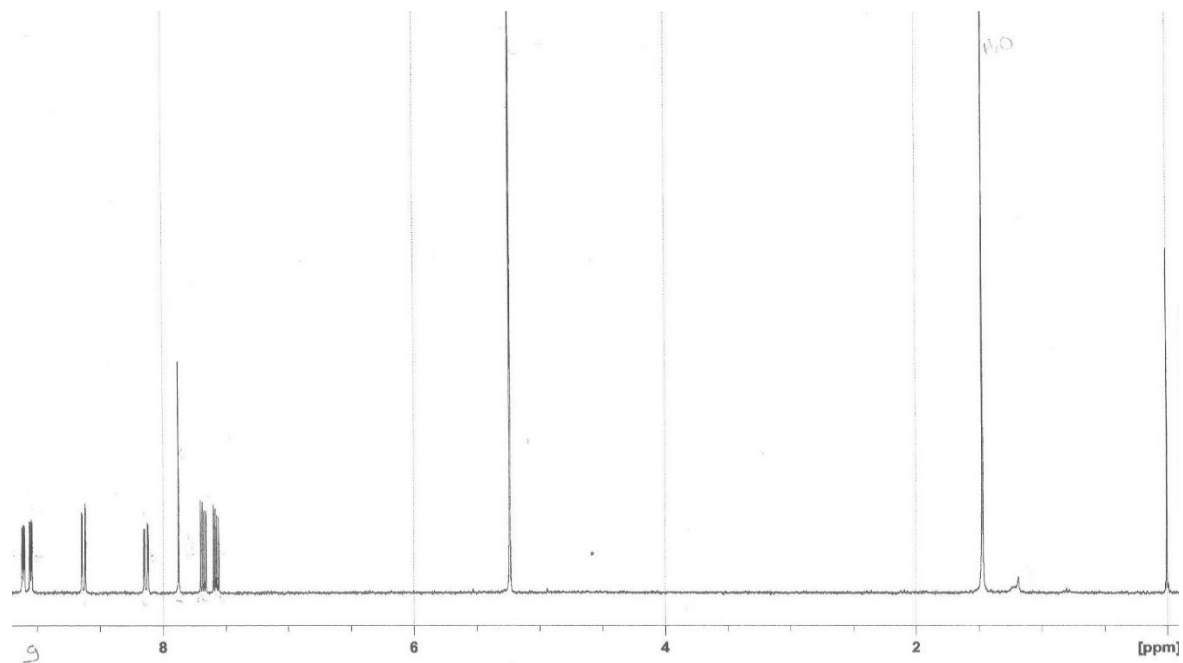


Figura 17. (A) Espectro RMN ^1H del ligando 4 (5-nitro-1,10- fenantrolina) en CD_2Cl_2 .
(B) Espectro RMN ^1H del complejo sintetizado con el ligando 4 en D_2O .

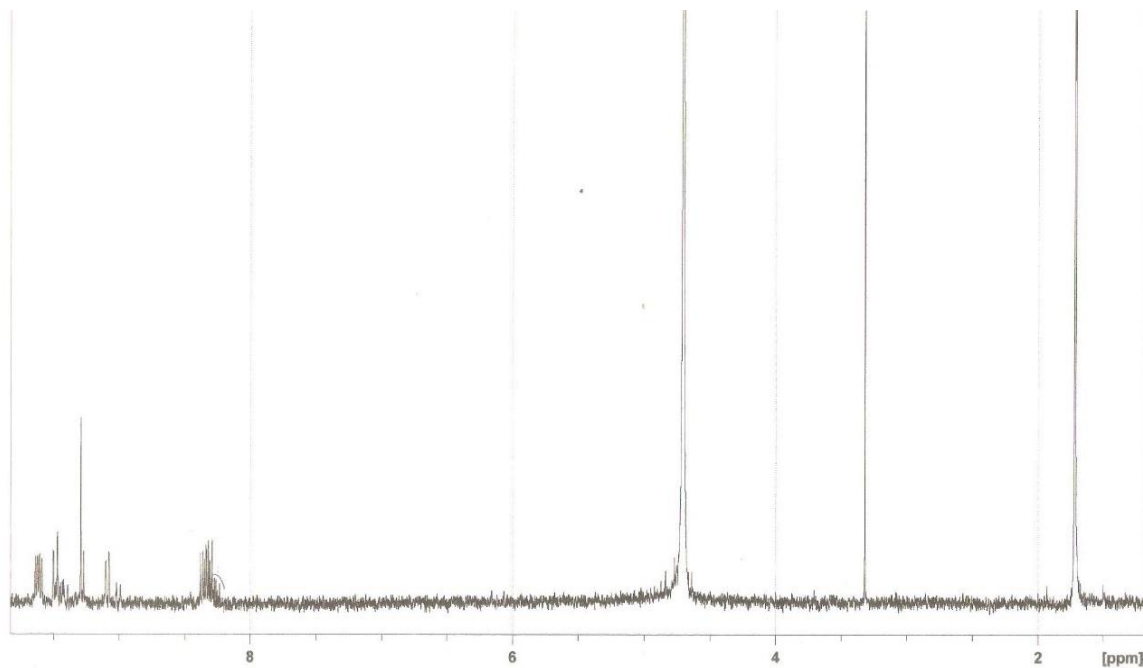
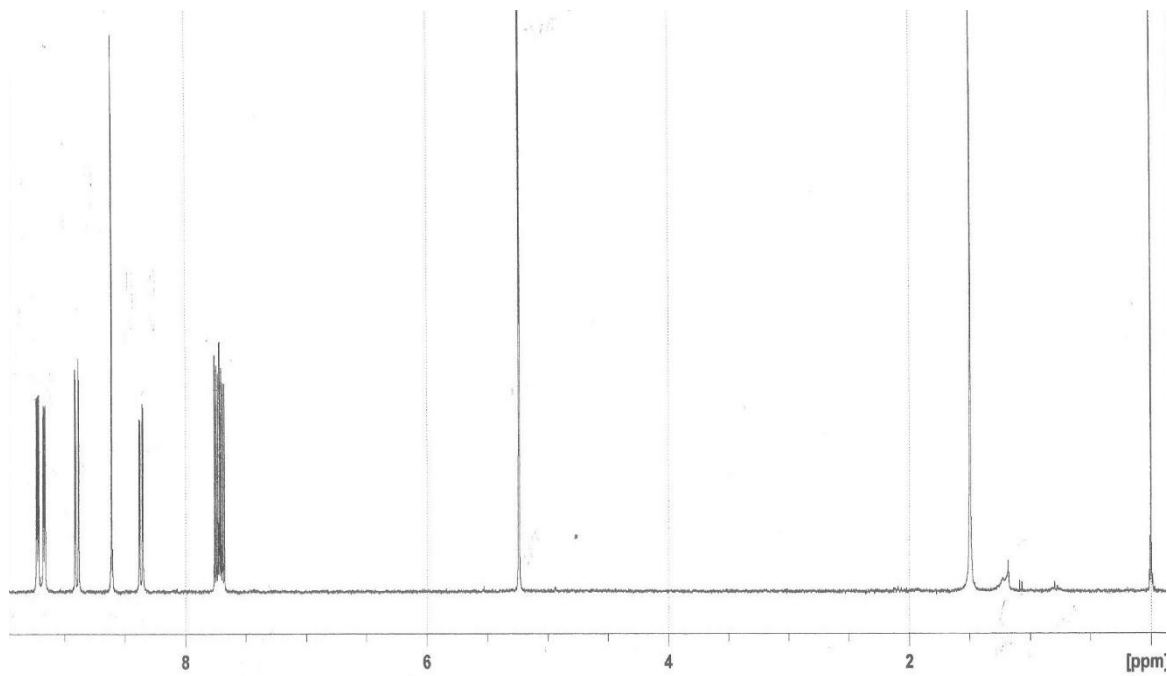


Figura 18. (A) Espectro RMN ^1H del ligando 5 (4,7-dimetoxi-1,10- fenantrolina) en CD_2Cl_2 . (B) Espectro RMN ^1H del complejo sintetizado con el ligando 5 en CD_2Cl_2 .

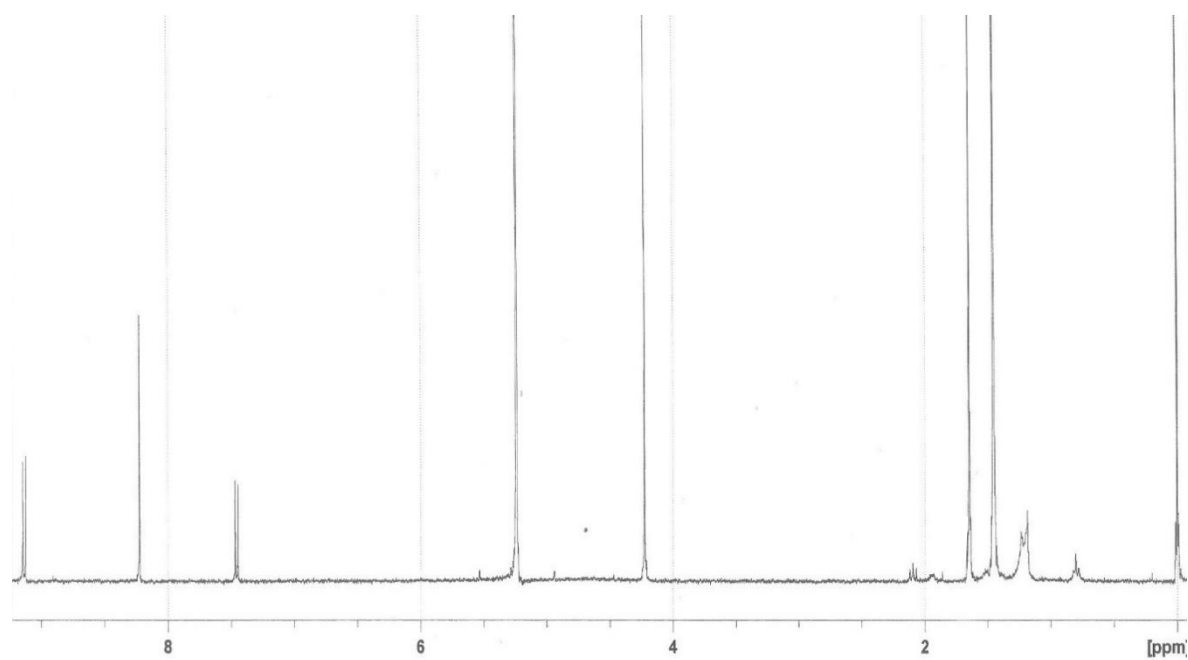
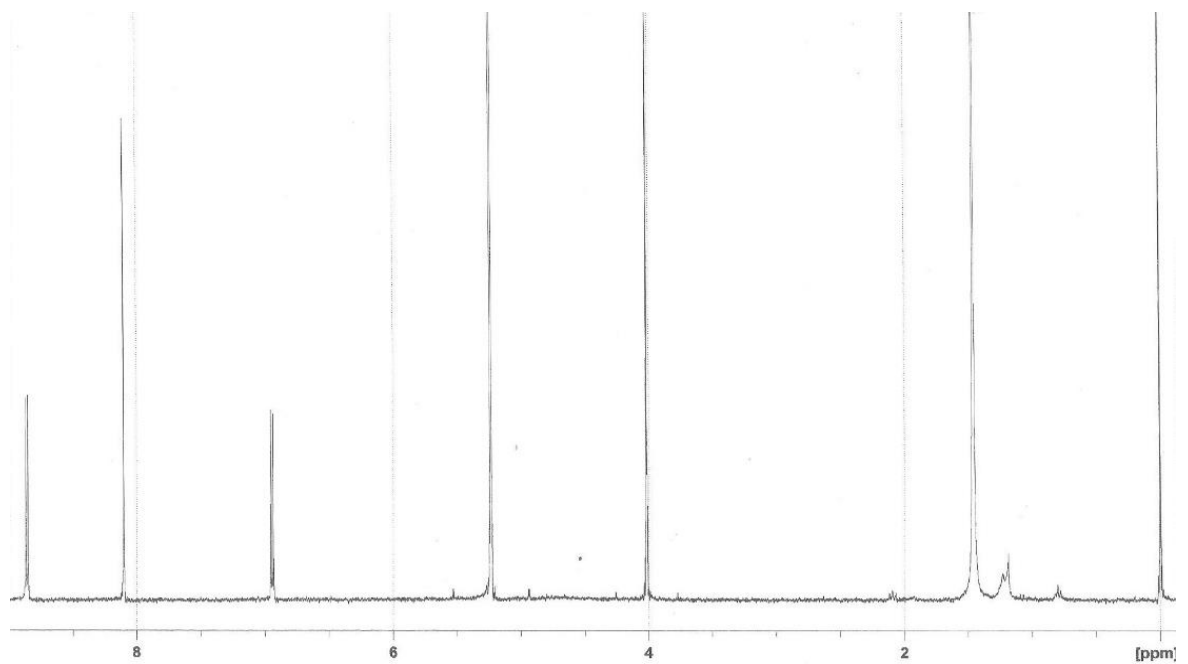


Figura 19. (A) Espectro RMN ^1H del ligando 6 (1,10- fenantrolina-4,7-diona) en CD_2Cl_2 . (B) Espectro RMN ^1H del complejo sintetizado con el ligando 6 en D_2O .

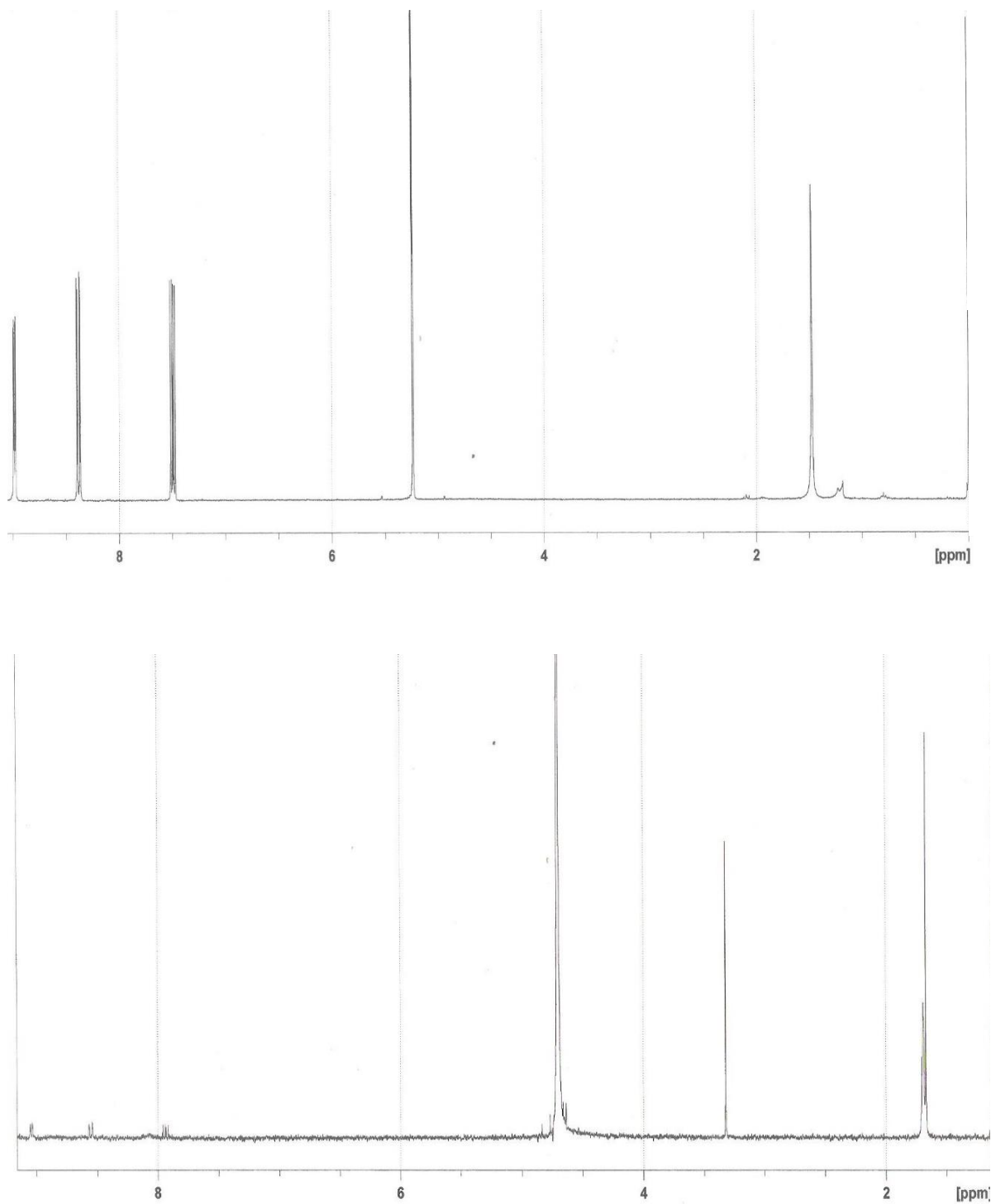
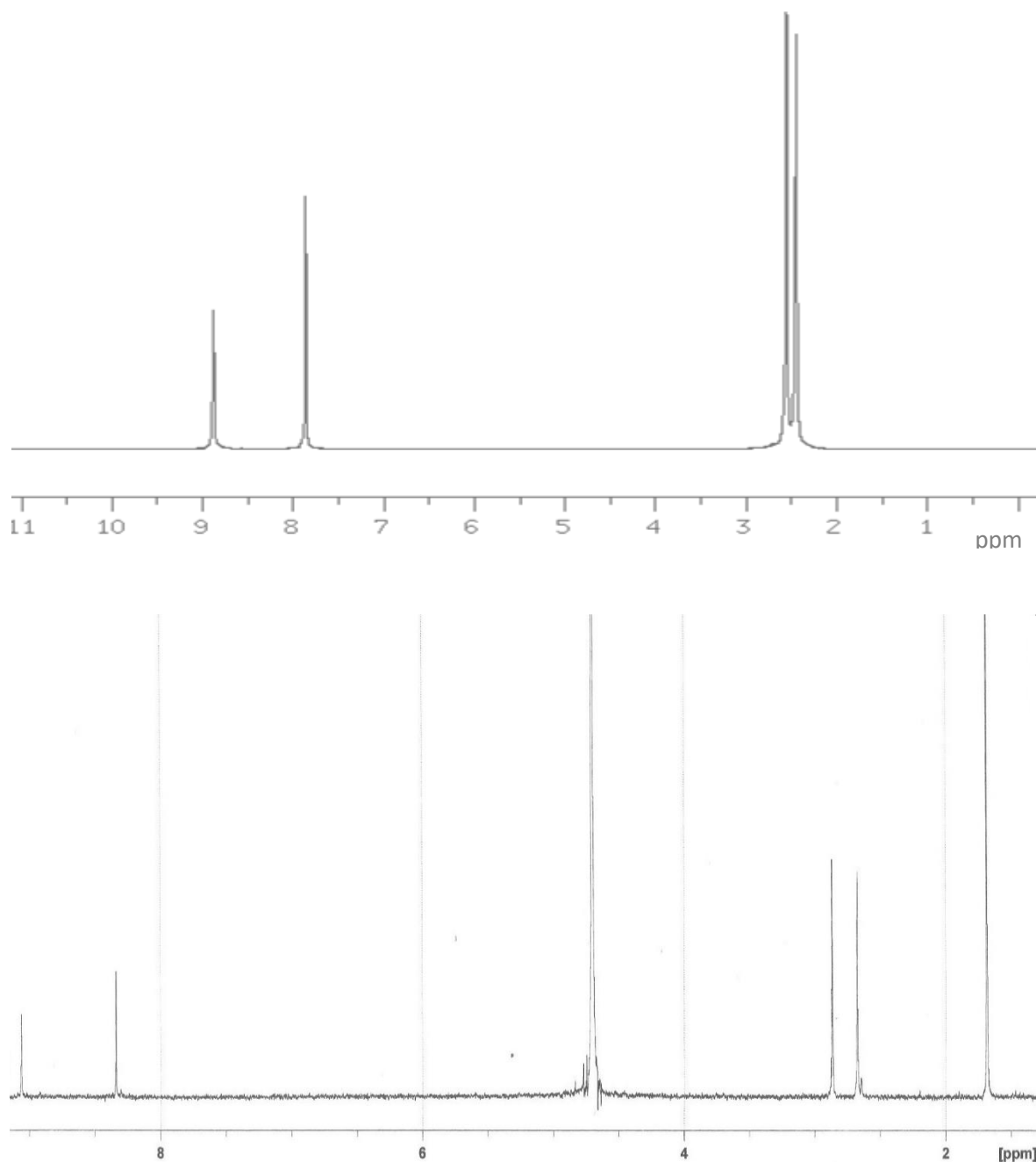


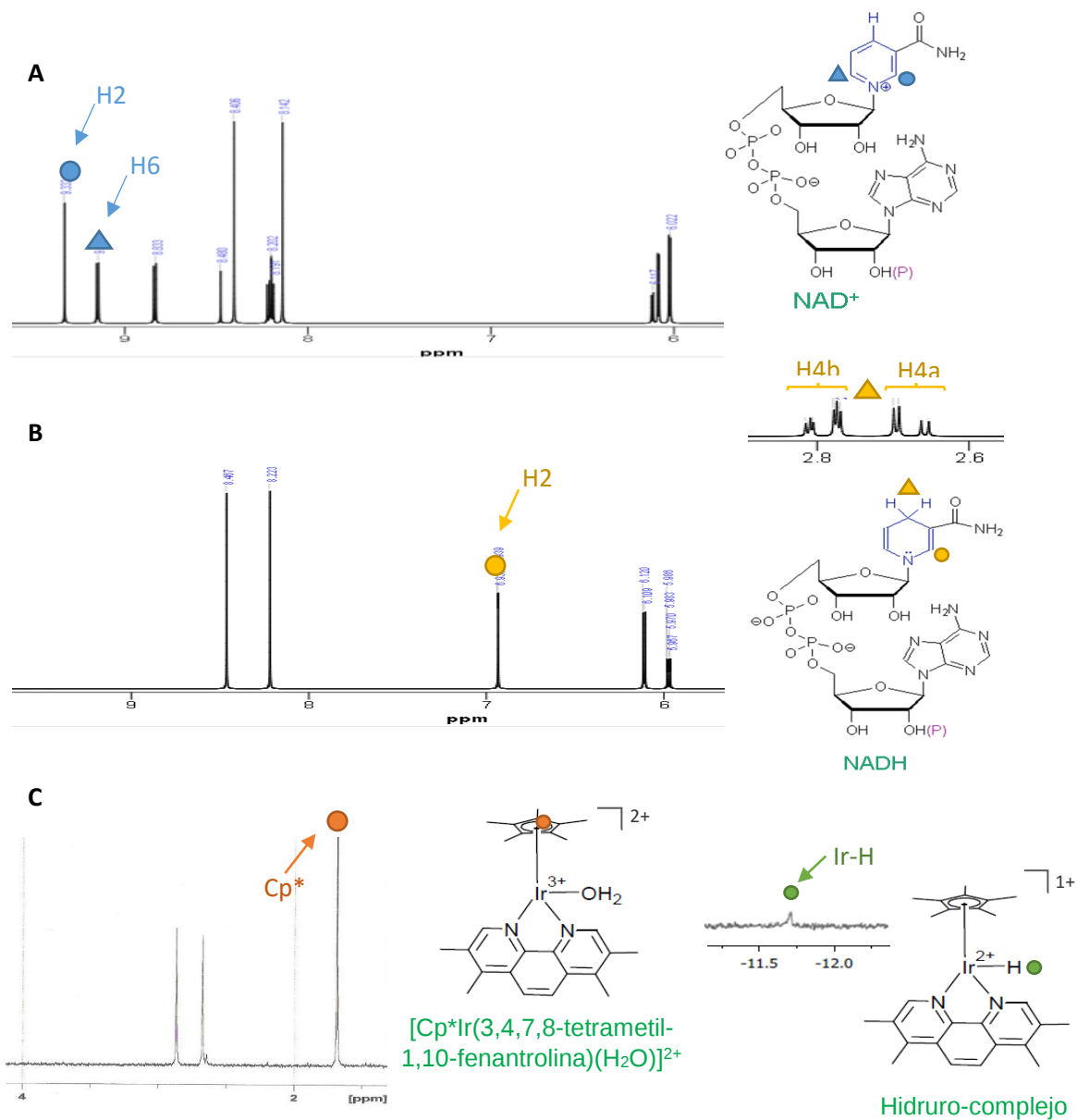
Figura 20. (A) Espectro RMN ^1H del ligando 8 (3, 4, 7,8-tetrametil-1,10- fenantrolina) en CDCl_3 . (B) Espectro RMN ^1H del complejo sintetizado con el ligando 8 en D_2O .



Fuente: (A) Tomado de Spectral Database for Organic Compounds, SDBS.

ANEXO C. SEÑALES ESCOGIDAS PARA LA INTEGRACIÓN

Figura 21. Espectros del (A) NAD⁺, (B) NADH y (C) complejo 8 sintetizado, con las señales escogidas para la integración.



Fuente: (A) y (B) tomados y modificados de The Human Metabolome Database (HMDB).

Tabla 3. Señales escogidas de los espectros ^1H RMN para la integración

Compuesto	Protón	Delta [ppm]
NAD ⁺	H2	9,33
	H6	9,15
NADH	H2	6,94
	H4a-H4b	2,65 – 2,82
Complejo	Cp*	1,69
Complejo hidruro	Ir-H	-11,75

Cabe resaltar que los desplazamientos escritos no son los mismos para todos los espectros, pues éstos dependen del complejo que se esté empleando; sin embargo, sus valores oscilan alrededor de los propuestos anteriormente.

ANEXO D. ESPECTROS RMN ^1H OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS DE REGENERACIÓN CON LOS COMPLEJOS SINTETIZADOS

Figura 22. Espectros RMN ^1H de 15 mM de 1,4-NADH con 1 mM de complejo con ligando 2 (4-metil-1,10- fenantrolina) en 90% H_2O /10% D_2O a 310 K, a diferentes tiempos de la reacción. Derecha: región del hidruro complejo (x4).

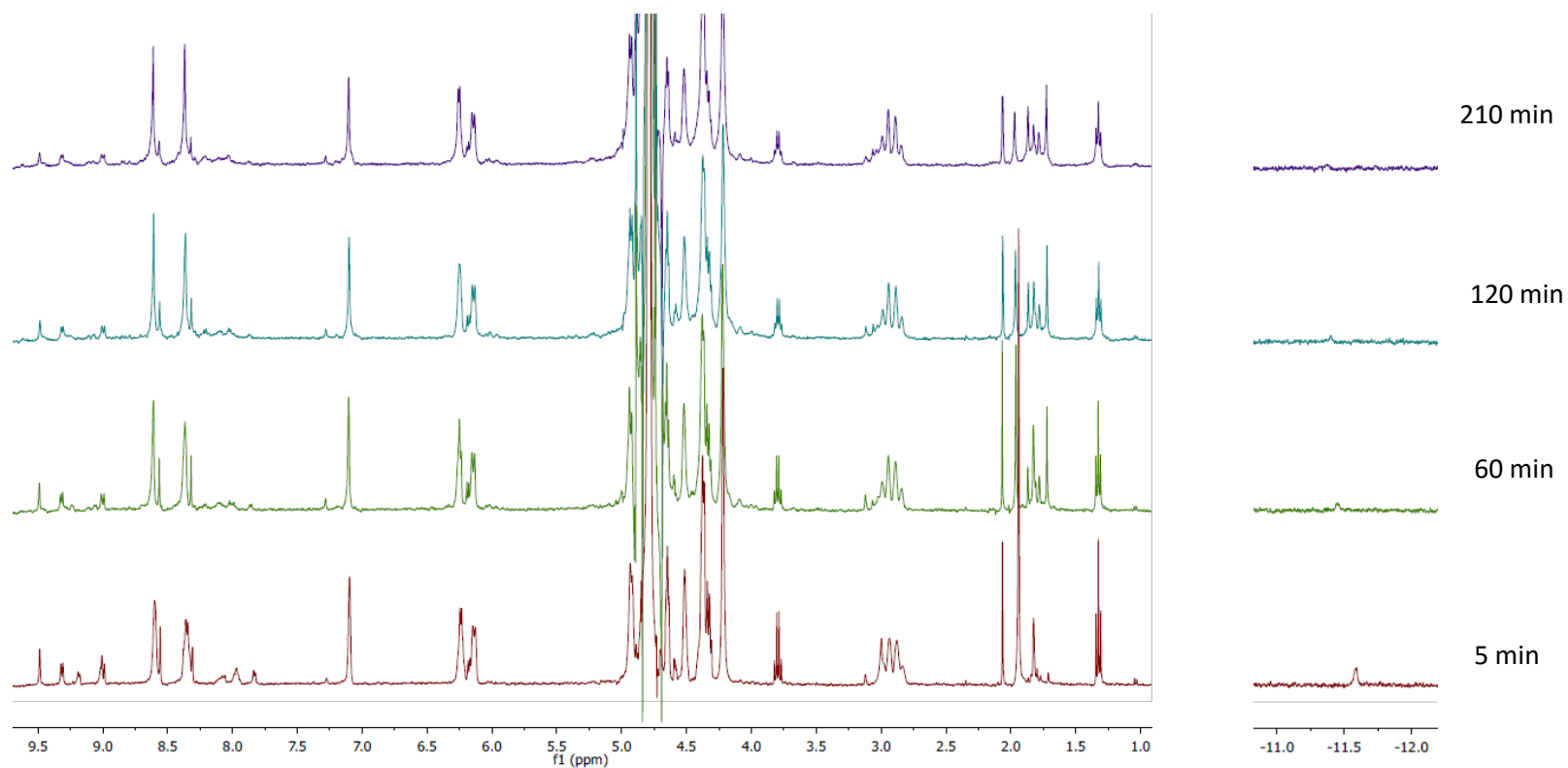


Figura 23. Espectros RMN ^1H de 140 mM de 1,4-NADH con 15 mM de complejo con ligando 3 (5-cloro-1,10-fenantrolina) en 90% H_2O /10% D_2O a 310 K, a diferentes tiempos de la reacción. Derecha: región del hidruro complejo

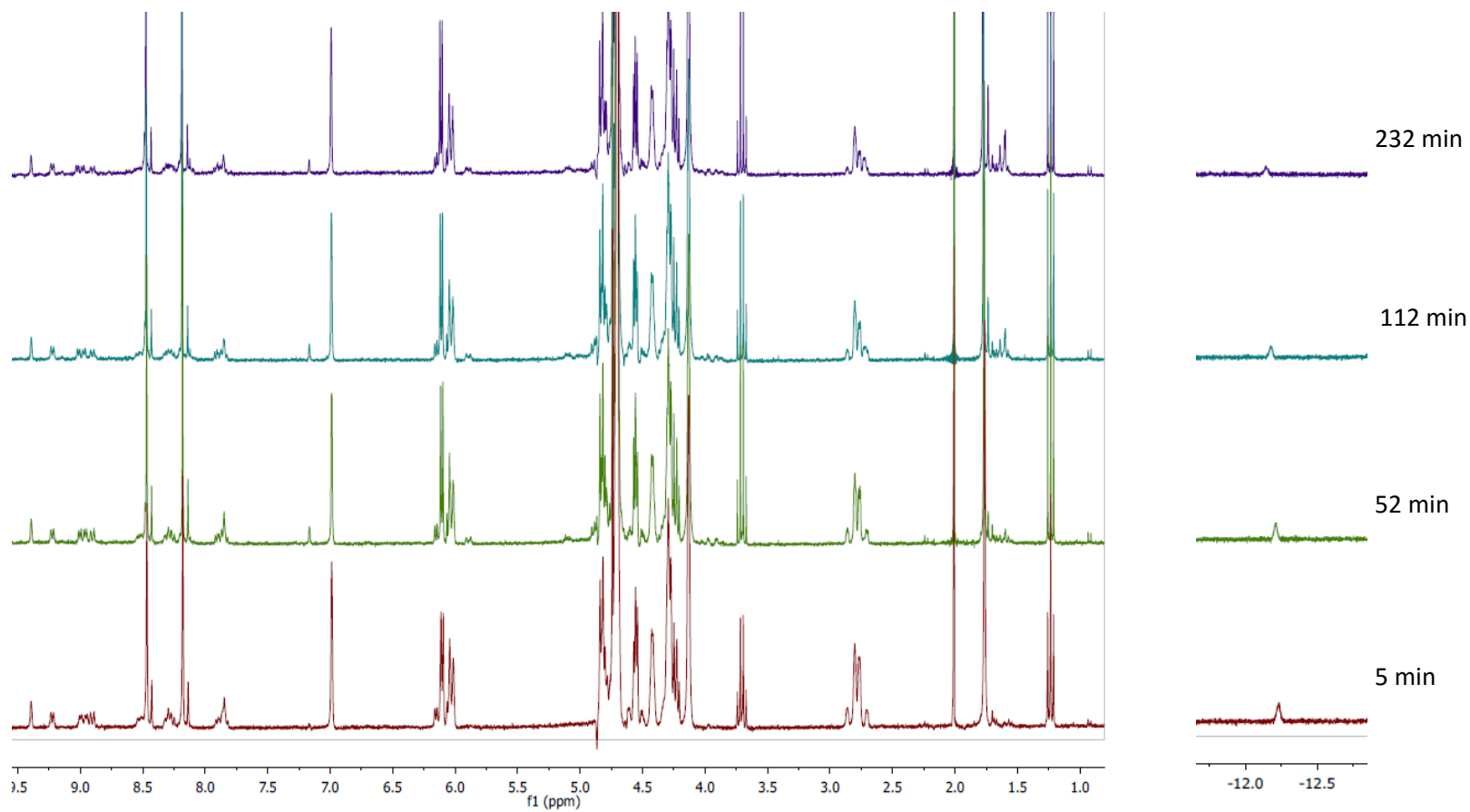


Figura 24. Espectros RMN ^1H de 30 mM de 1,4-NADH con 3 mM de complejo con ligando 4 (5-nitro-1,10- fenantrolina) en 90% H_2O /10% D_2O a 310 K, a diferentes tiempos de la reacción. Derecha: región del hidruro complejo (x1).

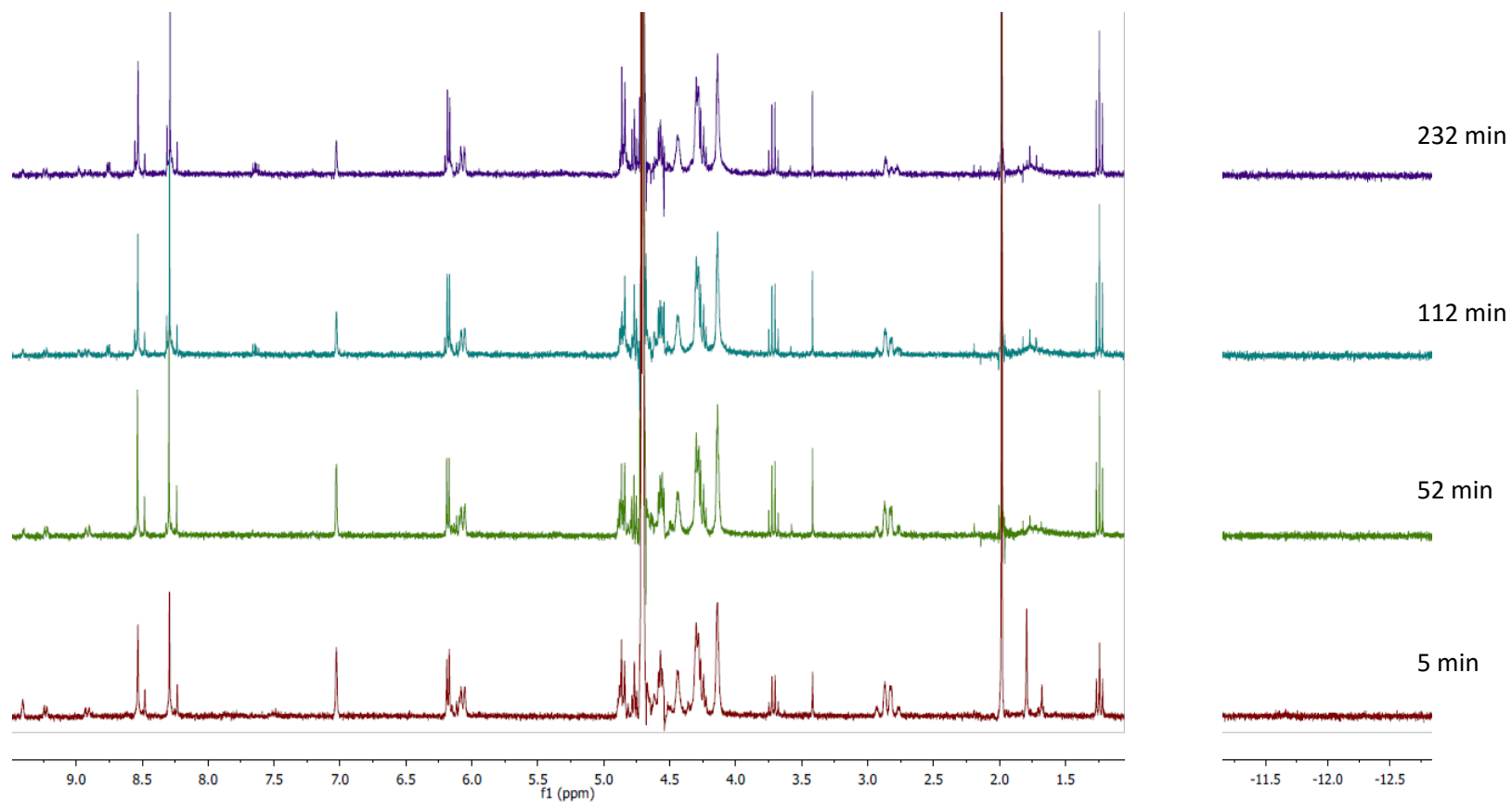


Figura 25. Espectros RMN ^1H de 15 mM de 1,4-NADH con 1 mM de complejo con ligando 7 (4, 7-dimetoxi-1,10-fenantrolina) en 90% H_2O /10% D_2O a 310 K, a diferentes tiempos de la reacción. Derecha: región del hidruro complejo (x5).

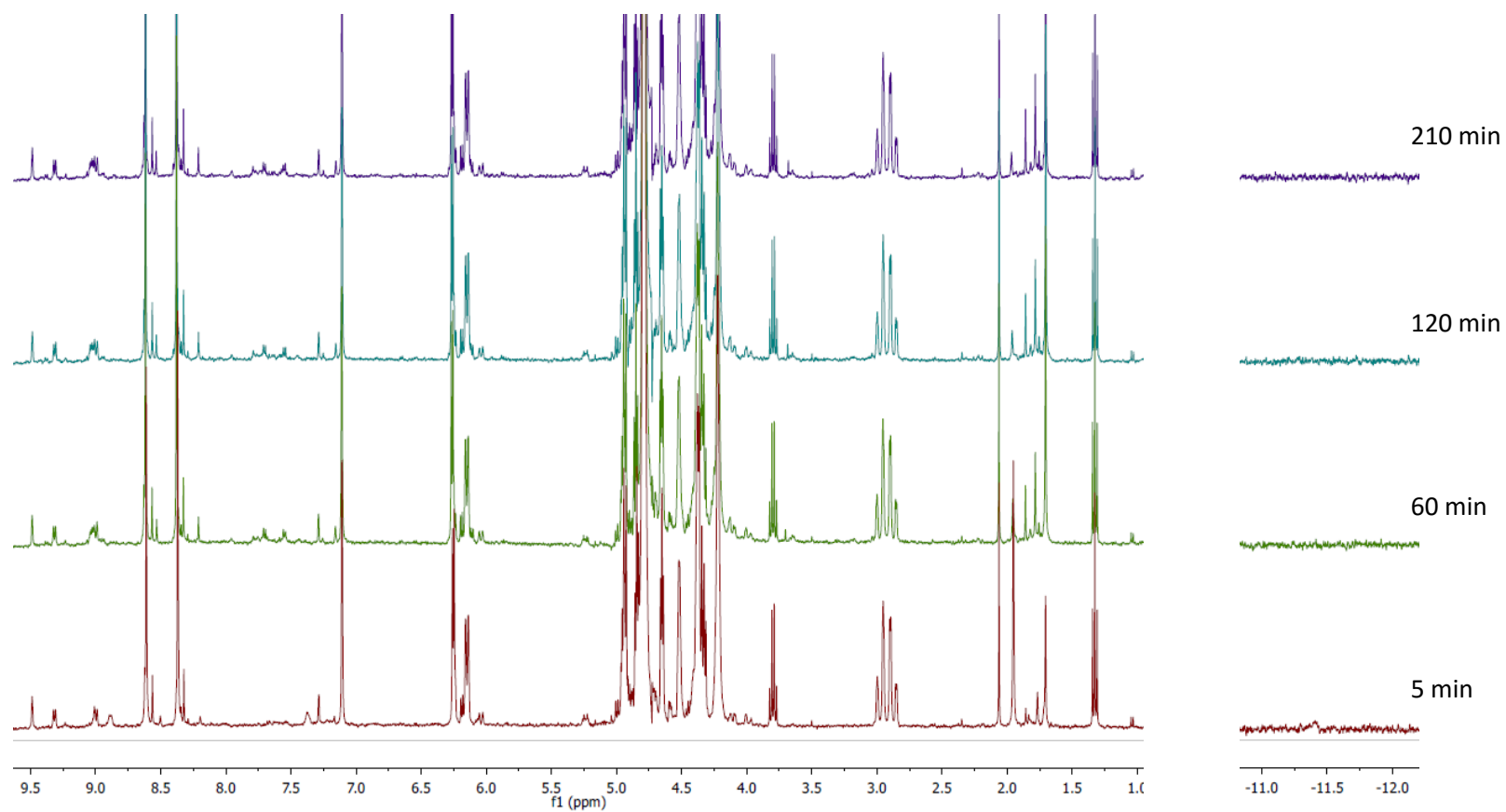
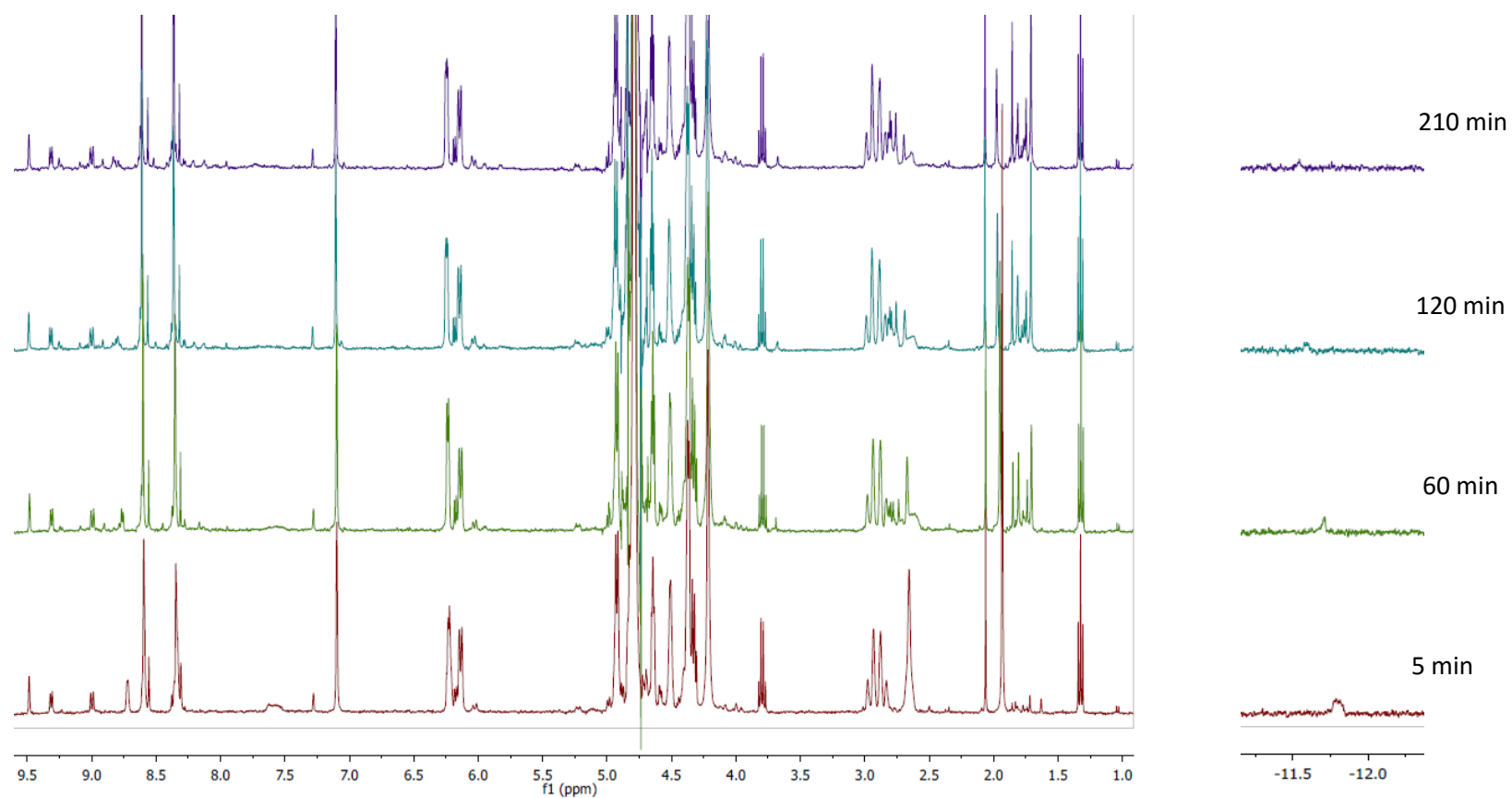


Figura 26. Espectros RMN ^1H de 15 mM de 1,4-NADH con 1 mM de complejo con ligando 8 (3, 4, 7, 8-dimetoxi-1,10-fenantrolina) en 90% H_2O /10% D_2O a 310 K, a diferentes tiempos de la reacción. Derecha: región del hidruro complejo (x4).



ANEXO E. CÁLCULOS REALIZADOS

Después de determinar las integrales de los picos de las especies, se pueden calcular las concentraciones con la siguiente relación:

$$Concentración_{especie} = \frac{integral_{especie}}{integral_{ref}} * \frac{N^{\circ}hidrógenos\ pico_{ref}}{N^{\circ}hidrógenos\ pico_{especie}} * concentración_{ref}$$

Siendo la concentración de la referencia 58 mM para los complejos 3 y 4, y 2 mM para el resto de complejos. El número de hidrógenos de los picos se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 4. Número de hidrógenos correspondientes a la señal escogida de cada especie.

Especie	N° hidrógenos
Referencia	3
Hidruro	1
Cp*	15
NADH en δ 2,65 – 2,82	2
NADH en δ = 6,94	1
NAD+ en δ = 9,15	1
NAD+ en δ = 9,33	1

La concentración del NADH se determina como el promedio de las concentraciones halladas para cada señal. Por otro lado, la concentración del NAD⁺ producido se calcula, teniendo en cuenta una impureza de NADH del 7,65% encontrada previamente por el equipo de investigación, de la siguiente manera:

$$C_{NAD+ prod} = \bar{C}_{NAD+} - 0,0765 * \bar{C}_{NADH_1}$$

Siendo $\bar{C}_{NAD+}$ el promedio de las concentraciones de NAD⁺ halladas para cada señal en cada intervalo de tiempo y $\bar{C}_{NADH_1}$ el promedio de las concentraciones de NADH a los 5 minutos de reacción (primer espectro obtenido).

Los tres parámetros calculados para determinar la actividad y la selectividad de los complejos fueron el número de ciclos catalíticos (TON, Total Turnover Number por sus siglas en inglés), la frecuencia del ciclo (TOF, Total Turnover Frequency por sus siglas en inglés) y la concentración de productos de descomposición, C_{PD} . El TON se calcula como la relación entre la concentración del NAD⁺ producido y la concentración del complejo a los 5 minutos, y el TOF se determina como el número de ciclos por hora; sin embargo, con el fin de establecer la comparación entre todos los complejos se tomó el TON a los 10 minutos de reacción y el TOF fue calculado a partir de éste.

$$TON = \frac{C_{NAD+ prod}}{C_{Cp*1}} \quad , \quad TOF = TON|_{10 min} * 6 \quad [h^{-1}]$$

La selectividad de cada complejo se mide, en este caso, con base en la concentración de productos de descomposición por mol de complejo y para determinarla se debe tener en cuenta lo siguiente:

$$C_{NADH_i} = \overline{C}_{NADH_1} + \overline{C}_{NAD+1}$$

$$C_{PD_t} = \overline{C}_{NADH_i} - \overline{C}_{NADH_t} - \overline{C}_{NAD+_t}$$

$$Selectividad = \frac{C_{PD_t}}{C_{p*1}}$$

Donde C_{NADH_i} es la concentración inicial del NADH, C_{PD_t} es la concentración de los productos de descomposición para cada tiempo y las concentraciones con subíndice 1 son aquellas determinadas a los 5 minutos de reacción.