

ESTUDIO POR RESONANCIA PARAMAGNETICA ELECTRONICA DEL COMPLEJO (2,6-PIRIDINA-ACIDO DICARBOXILICO)COBRE

Ana Laura Pérez, Nicolás I. Neuman, Alberto C. Rizzi, Carlos D. Brondino

Departamento de Física – Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas – Universidad Nacional del Litoral
Área: Ciencias Exactas. Subárea: Química

INTRODUCCION

El estudio de la estructura electrónica y las propiedades magnéticas de compuestos de metales de transición paramagnéticos como Cu(II), Co(II), Fe(III), es un área que tiene relevancia en química bioinorgánica (Kim y col., 2004), magnetismo molecular (Mrozinski, 2005) y en los últimos años en spintrónica (Timco y col., 2009). La espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR), especialmente aplicada a monocristales, es muy útil para relacionar el magnetismo con la estructura de los caminos químicos que comunican los iones en la red cristalina. Esta información es relevante ya que puede extenderse al estudio de procesos de transferencia electrónica en enzimas redox.

La técnica de EPR consiste en separar los niveles de energía de espín en una muestra paramagnética (que posee electrones desapareados) mediante un campo magnético **B** externo, e inducir transiciones entre estos niveles aplicando radiación de microondas. Realizando un barrido del campo **B** a frecuencia de microondas constante se observan una o más líneas de resonancia a distintos valores de **B**, a partir de cuyas posiciones se pueden determinar parámetros asociados a la estructura electrónica de la especie paramagnética estudiada. Por otro lado, el estudio en monocristales orientados también permite obtener información de diferentes interacciones entre espines, como por ejemplo interacción hiperfina entre espín nuclear y electrónico, e interacción dipolar e interacción de intercambio isotrópica entre espines electrónicos, siendo esta última caracterizada por la constante de acoplamiento *J*. Esta constante está íntimamente relacionada con la velocidad de transferencia electrónica en proteínas redox (Marcus y col., 1985; Calvo y col. 2001).

El ión Cu(II) es un metal de transición con configuración $3d^9$ ($S=1/2$) y de gran relevancia biológica ya que participa en el sitio activo de diversas enzimas redox, como por ejemplo la nitrito reductasa, la tirosinasa, la catecol oxidasa, proteínas de transporte como la hemocianina y proteínas de transferencia electrónica como la pseudoazurina (Solomon y col., 2001; Ferroni y col., 2014).

En este trabajo se sintetizaron y cristalizaron dos complejos diferentes del ión Cu(II) con el ligando ácido dipicolínico (2,6-piridina-ácido dicarboxílico) en los cuales los iones Cu(II) están conectados por diferentes tipos de uniones químicas, típicas de las que aparecen en metaloproteínas involucradas en procesos de transferencia electrónica.

OBJETIVOS

- Sintetizar y cristalizar sistemas inorgánicos de iones Cu(II) con ligandos de bajo peso molecular de relevancia biológica, como el ácido dipicolínico. Determinar la estructura cristalina de los complejos cristalizados en el caso que sea desconocida.

Proyectos acreditados en los que se enmarca la investigación

1. Síntesis y caracterización espectroscópica de complejos de metales de transición con ligandos de interés biológico. (CAID-UNL 501 20110100376 LI) Financiado por UNL. 2013-2015. Director: Alberto C. Rizzi
2. Caracterización fisicoquímica de cadenas de transferencia electrónica en metaloenzimas redox con aplicaciones biotecnológicas (PICT-2014-1742). Financiado por FONCYT-MINCYT. 2015-2017 Director: Carlos D. Brondino).
3. Estructura, función, y magnetismo en metaloenzimas que participan en los ciclos del nitrógeno y el azufre (PIP-112-20110101045). Financiado por CONICET. 2013-2015 Director: Carlos D. Brondino.

Director del autor: Carlos D. Brondino. Co-Director del autor: Alberto C. Rizzi.

- Estudiar las propiedades electrónicas del ión Cu(II) mediante EPR en muestras policristalinas y en monocristales orientados con el fin de evaluar la estructura electrónica del ión Cu(II) y las interacciones que aparecen entre ellos.

METODOLOGIA

Síntesis y cristalización: se disolvieron 221 mg de carbonato básico de cobre (Fluka 95%) en 100 mL de agua desionizada (20 mM) a 65 °C y se añadieron 334 mg de ácido dipicolínico (Dipic) (Sigma 99 %), manteniendo en agitación a 65°C durante 2 horas. Luego, la solución se filtró y se la dejó cristalizar a temperatura ambiente. Al cabo de unos días aparecieron dos tipos de monocristales con morfologías distintas, uno de color celeste (CuDipicC) y el otro de color azul (CuDipicA).

Caracterización por RX: se realizó Difracción de Rayos X (DRX) de polvo de los dos cristales para determinar si su estructura se encontraba reportada en la Base de Datos Cristalográficos de Cambridge (CCDC).

Mediciones de EPR: se realizaron mediciones sobre muestra poli- y monocristalinas de los dos compuestos utilizando un espectrómetro Bruker EMX Plus a la frecuencia de microondas de banda X (~9.5 GHz) y a temperatura ambiente. Para las mediciones en monocristales orientados, se determinó previamente la morfología del cristal usando un microscopio goniométrico Carl Zeiss para conocer el hábito del crecimiento del cristal. Posteriormente se montó el monocristal sobre un cristal cúbico de KCl (que define un sistema de referencia ortogonal xyz), y este se apoyó sobre un pedestal cilíndrico solidario a un goniómetro, el cual se introdujo en la cavidad resonante del espectrómetro de EPR, y se adquirieron espectros de EPR desde 0° a 180° cada 10°, en los planos cristalinos a^*b , ca^* y cb para el CuDipicC y en los planos cristalinos a^*b^* , cb^* y ca^* para el CuDipicA. Se determinó la posición central B_0 de la resonancia observada y se calculó el factor g para cada orientación, utilizando la ecuación

$$g = \frac{h\nu}{\mu_B B_0} \quad (1)$$

donde μ_B es el magnetón de Bohr, h la constante de Planck y ν la frecuencia de microondas. La variación angular del factor g^2 fue ajustada con la ecuación

$$g^2(\theta, \varphi) = g_{xx}^2 \sin^2 \theta \cos^2 \varphi + g_{yy}^2 \sin^2 \theta \sin^2 \varphi + g_{zz}^2 \cos^2 \theta + 2g_{xy}^2 \sin^2 \theta \cos \varphi \sin \varphi + 2g_{zx}^2 \sin \theta \cos \varphi \cos \theta + 2g_{zy}^2 \sin \theta \sin \varphi \cos \theta \quad (2)$$

en la cuál $xyz = a^*bc$ y a^*b^*c para CuDipicC y CuDipicA, respectivamente, θ representa el ángulo que forma el campo magnético \mathbf{B} con el eje cristalino c y φ el ángulo que forma la proyección de \mathbf{B} en el plano a^*b o a^*b^* con el eje a^* , respectivamente. Los espectros de EPR fueron ajustados por cuadrados mínimos utilizando la derivada de una función Lorentziana.

RESULTADOS

Estructura cristalina y molecular

Los difractogramas de polvo obtenidos por DRX indicaron estructuras ya reportadas en la Base de Datos Cristalográficos de Cambridge (CCDC).

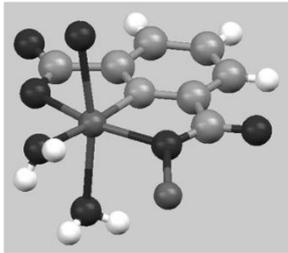


Fig 1a. Coordinación octahédrica del ión Cu(II) en el CuDipicC.

El cristal CuDipicC está formado por cuatro moléculas idénticas (Fig. 1b) relacionadas por un centro de inversión y por las operaciones de simetría $(x, \frac{1}{2}-y, \frac{1}{2}+z)$ y $(-x, \frac{1}{2}+y, \frac{1}{2}-z)$. También se muestran las conexiones entre diferentes iones Cu(II) en la celda unitaria, en los cuales los centros metálicos están conectados por uniones puentes de hidrógeno y un puente monoatómico que involucra un O carboxilato.

CuDipicC (celeste): cristaliza en el grupo espacial monoclinico $P2_1/c$ con parámetros de red $a, b, c = 7.2223, 19.064, 6.4358 \text{ \AA}$, $\alpha = \gamma = 90^\circ$ y $\beta = 107.110^\circ$. En la Fig. 1a se muestra la coordinación octahédrica del ión Cu(II), el que se encuentra coordinado a dos O carboxílicos pertenecientes al ácido dipicolínico, a un N piridínico, a dos moléculas de agua y a un O carboxilato de un ligando vecino que completa la esfera de coordinación. La celda unidad del

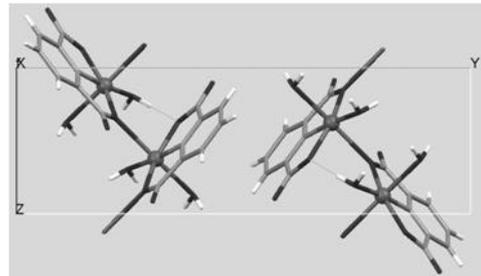


Fig. 1b. Caminos químicos que conectan los iones Cu(II) en el compuesto CuDipicC.

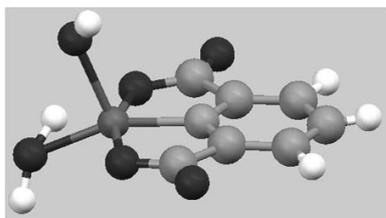


Fig 2a. Coordinación piramidal cuadrada del ión Cu(II) en el CuDipicA.

La celda unidad del cristal CuDipicA (Fig. 2b) está formada por 2 moléculas idénticas relacionadas por un centro de inversión. También se muestran las conexiones entre los iones Cu(II) en la celda unitaria, en la cual los centros metálicos están conectados por uniones puentes de hidrogeno y del tipo $\pi-\pi$ *stacking* con moléculas de celdas vecinas.

CuDipicA (azul): cristaliza en el grupo espacial triclínico $P-1$ con parámetros de red $a, b, c = 4.732, 9.001, 10.365 \text{ \AA}$, $\alpha = 81.13^\circ$, $\beta = 85.74^\circ$ y $\gamma = 83.27^\circ$. En la Fig. 2a se muestra la coordinación piramidal cuadrada del ión Cu(II), el cual se encuentra coordinado a dos O carboxílicos pertenecientes al ácido dipicolínico, a un N piridínico y a dos moléculas de agua. La celda unidad del cristal CuDipicA (Fig. 2b) está

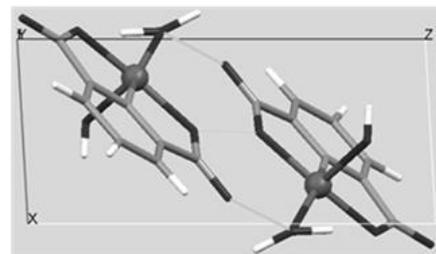


Fig. 2b. Caminos químicos que conectan los iones Cu(II) en el compuesto CuDipicA.

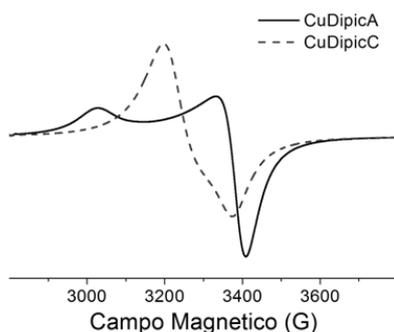


Fig 3a. Espectros de EPR de polvo de los compuestos CuDipicC y CuDipicA.

EPR

En la Fig. 3a se muestran los espectros de EPR de polvo de los complejos obtenidos CuDipicC y CuDipicA en Banda X. En la Fig. 3b se muestran algunos de los espectros de EPR representativos adquiridos en la variación angular para los monocristales CuDipicC y CuDipicA en los planos cristalinos. Para los dos compuestos se observó una única línea de resonancia para cualquier orientación del campo magnético \mathbf{B} en los 3 planos cristalinos medidos. En el caso del compuesto triclínico, se observa cierta estructura hiperfina parcialmente

resuelta para algunas orientaciones del campo magnético **B**.

A partir de las variaciones angulares realizadas en los tres planos cristalinos de cada monocristal, se calcularon las componentes del tensor **g** usando la ecuación 2. La simetría de la variación angular se corresponde con la de los sistemas cristalinos para cada uno de los compuestos, confirmando la estructura cristalina de los mismos.

CONCLUSIONES

- Los espectros de EPR de polvo de ambos compuestos son típicos de Cu(II). CuDipicA muestra un espectro axial típico de Cu(II) en coordinación cuadrado planar. CuDipicC muestra un espectro típico de Cu(II) donde los iones Cu(II) no equivalentes se encuentran colapsados por intercambio. No se observa estructura hiperfina resuelta en ninguno de ellos, lo que indica interacciones de intercambio entre iones Cu(II) que la colapsan.
- Si bien CuDipicC presenta dos sitios magnéticamente no equivalentes por celda unitaria, se observa una única línea de resonancia en la variación angular, lo que indica presencia de interacción de intercambio entre iones Cu(II). El compuesto presenta un camino químico ecuatorial-apical con un solo ligando O carboxilato y un puente hidrogeno. Si bien la teoría predice que estos caminos químicos deberían tener J despreciables, en particular para este compuesto se espera que $J \geq 0,1 \text{ cm}^{-1}$. Este resultado es inusual para un camino químico de esta naturaleza, por lo cual las perspectivas futuras incluyen realizar mediciones de EPR a frecuencias mayores para confirmar este resultado.
- El compuesto CuDipicA presenta un único tipo de sitios de Cu(II) por celda unidad. El hecho de no observar estructura hiperfina resuelta, indica que $J \approx A$ (constante hiperfina), donde J se asocia a interacciones $\pi-\pi$ e interacciones puente de hidrógeno.

BIBLIOGRAFIA BASICA

- Calvo, R.; Isaacson, R. A.; Paddock, M. L.; Abresch, E. C.; Okamura, M. Y.; Maniero, A. L.; Brunel, L. C.; Feher, G., 2001. *J. Phys. Chem. B.* 105. 4053-4057.
- Ferroni, F. M.; Marangon, J.; Neuman, N. I.; Cristaldi, J. C.; Brambilla, S. M.; Guerrero, S. A.; Rivas, M. G.; Rizzi, A. C.; Brondino, C. D., 2014. Pseudoazurin from *Sinorhizobium meliloti* as electron donor to copper-containing nitrite reductase: influence of the redox partner on the reduction potentials of the enzyme copper centers. *Journal of Biological Inorganic Chemistry.* 19, 913-921.
- Kim, E., Chufan E. E., Kamaraj K., Karlin K. D., *Synthetic Models for Heme-Copper Oxidases*, *Chem. Rev.*, 104 (58), 1077-1133.
- Marcus, R. A.; Sutin, N., 1985. *Biochim. Biophys. Acta- Reviews on Bioenergetics.* 811. 265-322.
- Mrozinski, J., 2005. New trends of molecular magnetism, *Coord. Chem. Rev.* 249 (15), 2534-2548.
- Solomon, E.I.; Chen, P.; Metz, M.; Lee, S.K.; Palmer, A.E., 2001. Oxygen Binding, Activation, and Reduction to Water by Copper Proteins. *Angewandte Chemie - International Edition.* 40: 4570-4590.
- Timco, G. A., Carretta, S., Troiani, F., Tuna, F., Pritchard, R. J., Muryn, C. A., McInnes, E. J. L., Ghirri, A., Candini, A., Santini, P., Amoretti, G., Affronte, M., Winpenny, R. E. P., 2009, Engineering the coupling between molecular spin qubits by coordination chemistry, *Nature Nanotechnology*, 4, 173-178.

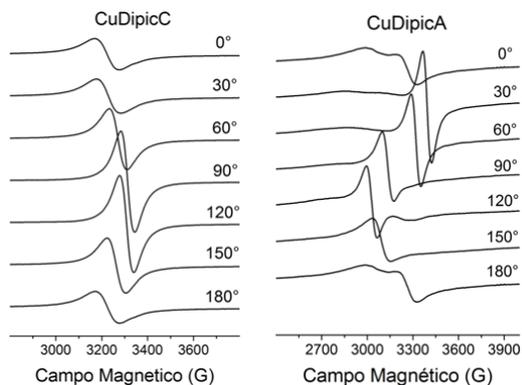


Fig. 3b. Espectros de EPR representativos de la variación angular de los monocristales CuDipicC y CuDipicA.