BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Instituto de Ciencias
Centro de Química

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Estudio cinético de la actividad antioxidante del compuesto de coordinación [(*N, N, N’, N’*-tetrakis-[*N*-((2-metilpiridin)etil)propanamida]etilendiamina)(clorodimetilésterprotoporfirinato)]Fe(III)”

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

Presenta:

Q. Nancy Lara Sánchez

Directora de tesis:
Dra. Yasmi Reyes Ortega

Puebla, Pue **Octubre 2018**

Comité Tutoral:

Dra. Sandra Elizabeth Pineda (CQ-ICUAP)

Dr. Samuel Hernández Anzaldo (CQ-ICUAP)

Dra. María de la Paz Elizalde González (CQ-ICUAP)

Dr. Miguel Ángel Muñoz Hernández (CIQ-UAEM)

Abreviaturas

DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

ecm = espín cuánticamente mezclado

g = gerade (simétrico a un centro de inversión)

HOMO = orbital molecular ocupado de más alta energía

IC_{50} = la mitad de la máxima concentración inhibitoria

IR = infrarrojo

LUMO = orbital molecular desocupado de más baja energía

mce = mezcla cuántica de espín

POG = productos de oxidación del guayacol

pp = clorodimetilésterprotoporfirinato

ppm = partes por millón

RMN = resonancia magnética nuclear

RPE = resonancia paramagnética electrónica

st = estiramiento

tpe = *N,N,N',N'*-tetrakis-[*N*((2-metilpiridina)-etil)propanoamida]etilendiamina

UV-Vis = ultravioleta-visible

u = ungerade (asimétrico a un centro de inversión)

δ opp = flexión fuera del plano

1 = [(tpe)(pp)]Fe(III)

ÍNDICE

Resumen 9
Resumen gráfico 10

CAPÍTULO I 11
1.1 Introducción 12
1.2 Antecedentes 14
1.2.1 Porfirinas 14
1.2.2 Potencial redox 15
1.2.3 Peroxidasas 16
1.2.4. Porfirinas-pinza 18
1.3 Justificación 19
1.4 Hipótesis 20
1.5 Objetivo general 20
1.5.1 Objetivos específicos 20

CAPÍTULO II 22
2. Metodología 23
2.1 Síntesis de 1 23
2.2 Instrumentos, condiciones y materiales 23
2.2.1 Estudios espectroscópicos 23
2.3 Actividad antioxidante 24
2.3.1 Actividad antioxidante por método del DPPH 24
2.3.2 Actividad antioxidante de peroxidasa 25
2.3.3 Estudios cinéticos de 1 25
2.4 Tratamiento estadístico 26
2.4.1 Tratamiento estadístico de datos de 1 26

CAPÍTULO III 29
3. Resultados y discusión de 1 30
3.1 Espectroscopía UV-Vis 30
3.2 Espectroscopía de IR 38
3.3 Espectroscopía de RMN-^{1}H 43
3.4 Espectroscopía de RPE 49
3.4.1 Espectroscopía de RPE de la reacción de 1 con H_2O_2 56
3.5 Determinación de la actividad antioxidante por método del DPPH 58
3.6 Actividad antioxidante de peroxidasa 63

3.7 Modelo enzimático de Michaelis – Menten 68

3.8 Estudios cinéticos 72

CAPITULO IV 81

Conclusiones 81
Bibliografía 83
Apéndice A 86

Índice de figuras, tablas, esquemas y gráficas

Figuras

Figura 1. ***Estructura general de los dendrímeros y sus diferentes generaciones*** **..... 12**

Figura 2. ***Estructura de un dendrímero de generación cero funcionalizado con piridilo*** **12**

Figura 3. ***Metaloporfirinas*** **..... 13**

Figura 4. ***Clorodimetilésterprotoporfirinato-Fe(III) y el ligante tpe*** **..... 14**

Figura 5. ***Estructura de la protoporfirina*** **..... 15**

Figura 6. Estructura propuesta de 1 **..... 23**

Figura 7. ***[(tpe)(pp)]Fe(III)1*** **..... 23**

Figura 8. ***Niveles de energía eléctrica, a) desdoblamiento energético del tpe, b) desdoblamiento energético de pp-Fe(III), c) desdoblamiento energético de 1.*** **..... 31**

Figura 9. ***Espectros de UV-Vis de 1 y pp-Fe(III).*** **..... 32**

Figura 10. ***Desdoblamiento de los orbitales d en un campo octaédrico*** **..... 34**

Figura 11. ***Serie espectroquímica de los ligantes*** **..... 34**

Figura 12. ***Orbitales frontera del modelo de Gouterman*** **..... 35**

Figura 13. ***a) Transiciónes de estados de S_0 a S_1 y S_0 a S_2 y b)Transiciones de porfirina*** **36**

Figura 14. ***Desdoblamiento de los orbitales de los electrones 5d del Fe(III) se dividen bajo la influencia de cambios en simetría molecular.*** **..... 37**

Figura 15. ***Desdoblamiento energético de los orbitales para un octaedro distorsionado con Fe(III) con diferentes estados de espín*** **..... 37**

Figura 16. ***Movimientos de estiramiento y flexión.*** **..... 39**

Figura 17. ***Vibraciones de estiramiento y flexión y sus diferentes movimientos*** **..... 39**

Figura 18. ***Potencial de energía contra distancia, x, para (a) un oscilador armónico (línea solida) y (b) un oscilador anarmónico (línea punteada)*** **..... 40**

Figura 19. ***Espectros comparativos de IR del tpe; pp-Fe(III) y 1 en $CH_3OH/CHCl_3$*** **..... 41**

Figura 20. ***Estructura del ligante tpe*** **..... 44**

Figura 21. ***Espectros de RMN-1H de pp-Fe(III) y 1. En a) se puede observar el espectro de pp-Fe(III) y en b) se observa el espectro de 1 El disolvente utilizado fue CD_3OD, temperatura 25°C.*** **..... 46**

Figura 22. ***Los dos niveles de energía permitidos para un núcleo con I = ½ en un campo magnético externo H_0.*** **..... 48**

Figura 23. ***Desdoblamiento energético en RPE*** **..... 49**

Figura 24. ***Espectro RPE de a) 1 y b) pp-Fe(III) en banda X a una temperatura de 90K.*** **..... 51**

Figura 25. ***Niveles de energía de los estados electrónicos hierro-porfirina en presencia de campo cristalino tetragonal y acoplamiento espín-orbita para: a) Δ/λ grande y negativa; b) Δ/λ grande y positiva; y c) Δ/λ ≤ I*** **..... 54**

Figura 26. Gráficas de Maltempo y Moss a) y b) [Maltempo & Moss, 2009], y c) es el porcentaje de espín s = 5/2, s = 3/2. 55

Figura 27. ***Espectro de RPE de*** **a) temperatura de 90 , b) reacción de 1 + H_2O_2 a temperatura de 77 K, ambos en banda X y c) acercamiento a la zona del radical. ……..64**

Figura 28. ***DPPH como radical libre y DPPH como molécula diamagnética*** **..... 60**

Figura 29. ***UV-Vis de DPPH en CH_3OH; tiempo de reacción 6h*** **..... 61**

Figura 30. ***UV-Vis de 1 con DPPH.Tiempo de reacción 24h*** **..... 61**

Figura 31. ***Porcentaje de reducción de 1 sobre el DPPH*** **..... 62**

Figura 32. ***Espectro de UV-Vis de 1 con Guayacol y H_2O_2.Tiempo de reacción 6 h*** **..... 65**

Figura 33. ***Espectro de UV-Vis de 1 con H_2O_2.Tiempo de reacción 2h*** **..... 66**

Figura 34. ***Espectro de UV-Vis de 1 con Guayacol.Tiempo de reacción 8h*** **..... 66**

Figura 35. ***Espectro de UV-Vis de H_2O_2 con Guayacol.Tiempo de reación 6h*** **..... 67**

Figura 36. ***Gráfica de v_0 en función de [S]*** **..... 69**

Figura 37. ***Gráfica de v_0 en función de [E]*** **..... 70**

Figura 38. ***La gráfica muestra la dependencia lineal de la v_0 con la concentración de 1*** **71**

Figura 39. ***La gráfica a) muestra la dependencia de v_0 con [H_2O_2]cuando se mantienen constantes [1] y [Guayacol]; la gráfica b) muestra la dependencia de v_0 con [Guayacol] cuando se mantienen constantes [1] y [H_2O_2].*** **..... 72**

Figura 40. ***Gráfica de [E_0]/v en función de 1/H_2O_2 para las tres concentraciones de Guayacol constantes.*** **..... 74**

Figura 41. ***Gráficas primarias para 1.*** **..... 75**

Figura 42. ***Gráfica secundaria para el complejo 1.*** **..... 76**

Esquemas

Esquema 1. ***Sitio activo de la peroxidasa*** **..... 16**

Esquema 2. ***Mecanismo de reacción del sitio activo de la peroxidasa. a) sitio activo en estado de reposo; b) oxidación del sitio activo y formación del radical π catiónico ferrilo; c) reducción del radical π catiónico ferrilo a catión ferrilo*** **..... 17**

Esquema 3. ***Esquema de reacción general de 1 con DPPH.*** **..... 63**

Esquema 4. ***Productos que se obtuvieron de la reacción entre peroxidasa y los diferentes sustratos*** **..... 64**

Esquema 5. ***Mecanismo enzima-sustrato*** **64**

Esquema 6. ***Ciclo normal de la peroxidasa*** **72**

Esquema 7. ***Cinética ping-pong peroxidasa*** **73**

Esquema 8. ***Esquema de ping-pong convencional*** **73**

Esquema 9. Propuesta de mecanismo de reacción para 1 ..... **90**

Tablas

Tabla 1. ***Proceso catódico de reducción*** **16**

Tabla 2. ***Concentraciones utilizadas para la reacción de actividad antioxidante.*** **26**

Tabla 3. ***Concentraciones de 1, guayacol y H_2O_2 para la determinación de los parámetros cinéticos.*** **26**

Tabla 4. ***Valores Críticos de Dixon´s r_{10} (Q) Parámetro tal como se aplicó a una prueba de dos colas a varios niveles de confianza, incluyendo el nivel de confianza de 90%.*** **27**

Tabla 5. ***Posición de bandas que se observan en los espectros de UV-Vis de pp-Fe(III) y de 1*** **33**

Tabla 6. ***Principales absorciones de IR de tpe, pp-Fe(III) y 1 en $CHCl_3$*** **42**

Tabla 7. ***Constante de fuerza de los principales enlaces de tpe, pp-Fe(III) y 1.*** **42**

Tabla 8. ***RMN-^1H de pp-Fe(III) y 1.*** **47**

Tabla 9. ***Porcentajes de mezcla cuántica de espín, s = 3/2, s = 5/2 en 1 y su precursor*** **56**

Tabla 10. ***Datos de la espectroscopía de RPE para 1-Fe(IV) comparados con los de 1.*** **58**

Tabla 11. ***Posición de bandas que se observan en los espectros de UV-Vis*** **67**

Tabla 12. ***Constantes de Michaelis-Menten y velocidad máxima teórica.*** **76**

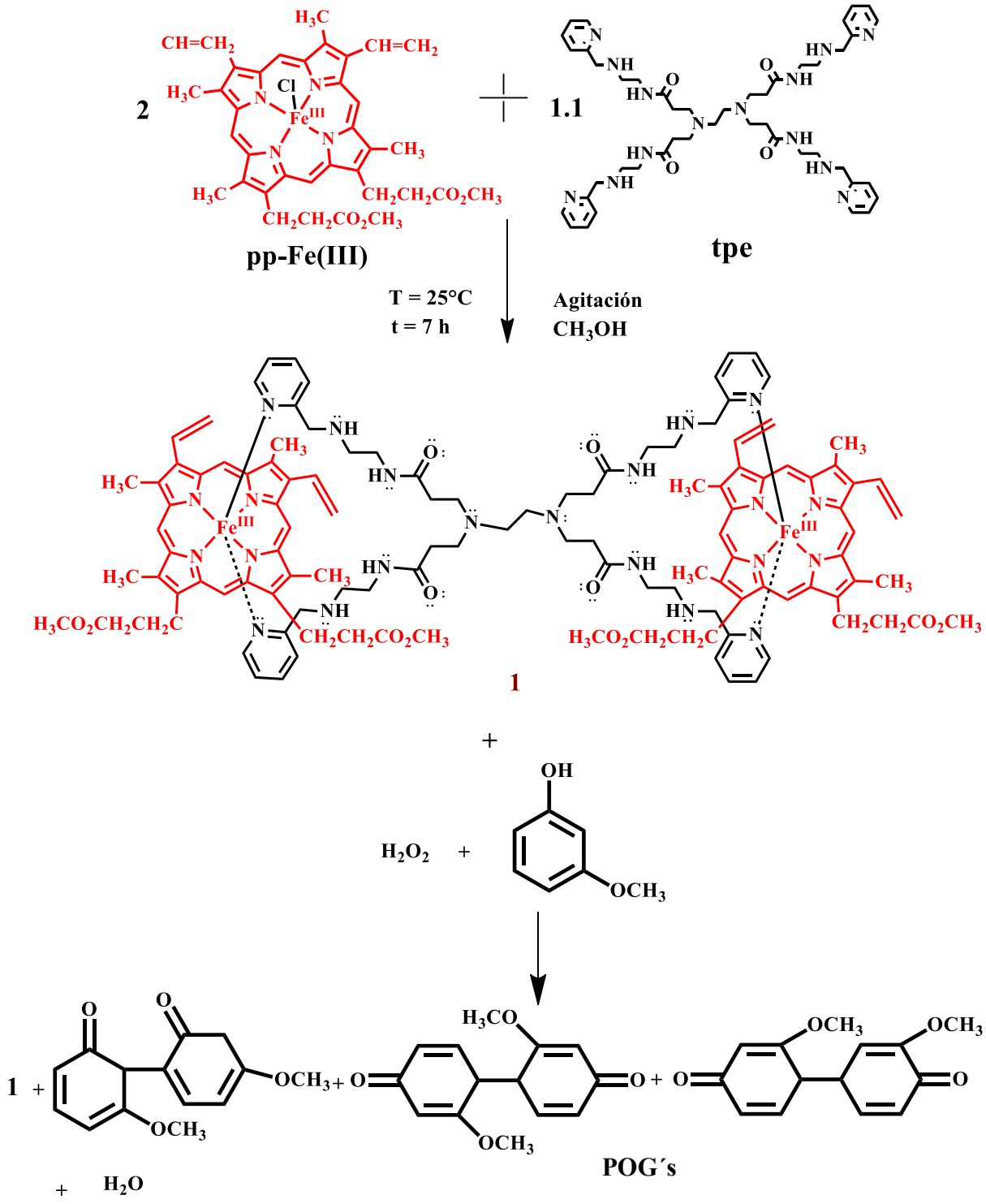
Tabla 13. ***Comparación de las constantes de Michaelis-Menten y velocidad máxima teórica*** **77**

Resumen

En este trabajo se presenta la obtención del compuesto de coordinación [(tpe)(pp)]Fe(III), **1**, a partir de la poliamina ramificada *N,N,N',N'*-tetrakis-[*N*-((2-metilpiridin)etil)propanamida] etilendiamina, **tpe**, con clorodimetilésterprotoporfirinato-Fe(III), **pp-Fe(III)**, como modelo electrónico, magnético, espacial y cinético de las enzimas peroxidasa. Se caracterizó **1** y su precursor por espectroscopía electrónica. En el espectro de UV-Vis de **1** se presentan cambios con respecto a su precursor en la energía de la banda Soret $\lambda_{máx}$ de 397 nm a 399 nm y bandas Q con $\lambda_{máx}$ de 484 y 598 nm a 479 y 591 nm. Por espectroscopía de IR se observaron las bandas características del ligante con $\bar{\nu}$N-H = 3223 cm^{-1}, $\bar{\nu}$C-H = 2924 cm^{-1} y las bandas del anillo porfirínico $\bar{\nu}$C-N = 1219 cm^{-1}, presentes en **1**. Por espectroscopía magnética de RMN-^{1}H de **1** se observaron los desplazamientos de las señales isotrópicas a menores frecuencias, para CH_3-hemo de 74.63 a 74.22 ppm para meso-H de 49.73 y -14.73ppm, con respecto a su precursor. En el espectro de RPE de **1** a T = 77 K se observaron dos tipos de especies de Fe(III) con ecm y con diferentes porcentajes de estados de espín. Una especie con porcentaje de 74% y con $s = 5/2 > 3/2$, la segunda especie con ecm en un porcentaje de 26% y con $s = 3/2 > 5/2$. Por RPE se confirma la presencia de ecm del Fe(III), $s = 3/2, 5/2$, como se esperaba. En la prueba con DPPH (2,2-difenil-1picrilhidrazilo), se observa que **1** no presenta una buena actividad como antioxidante, ya que la banda del radical libre del DPPH a $\lambda_{máx}$ = 515 nm no desaparece debido a que el Fe(III) tendría que reducirse a Fe(II), altamente inestable. Se caracterizó a **1** como modelo de enzima peroxidasa mediante la reacción de oxidación de guayacol, característica de enzimas peroxidasa, y se obtuvo un valor de la constante de velocidad máxima teórica k_{cat} = 5.4x10^4 $M^{-1}s^{-1}$, y las constantes de Michaelis -Menten con valores de $K_{Guayacol}$ = 1.6x10^{-4} M y $K_{H_2O_2}$ = 2.8x10^{-1} M, observándose una baja afinidad de **1** por el H_2O_2 y una mayor afinidad de la enzima oxidada por el guayacol. **1** dio un valor de k_{cat} tres órdenes de magnitud menor que la peroxidasa de rábano blanco.

Resumen gráfico

Síntesis de 1 y obtención de POG´s



CAPÍTULO I

1.Introducción y antecedentes

1.1 Introducción

Los dendrímeros son moléculas orgánicas poliméricas altamente ramificadas de tamaño nanoscópico y constan de tres partes principales: el núcleo, las capas interiores y los grupos terminales [Abbasi et al., 2014]. Además, se caracterizan por tener una estructura molecular compacta, **Figura 1**.

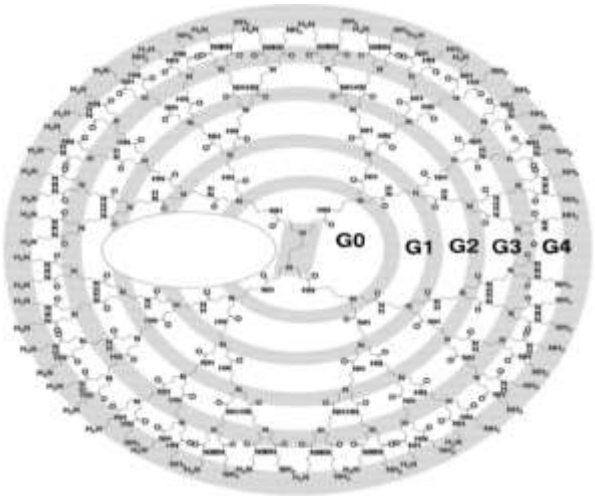


Figura 1. *Estructura general de los dendrímeros y sus diferentes generaciones* [Abbasi et al., 2014]

Mediante la funcionalización de la periferia de los dendrímeros con moléculas que posean átomos donadores de densidad electrónica, estos, actúan como ligantes que se pueden coordinar a iones metálicos, **Figura 2** [Cervantes-Mejía et al., 2014].

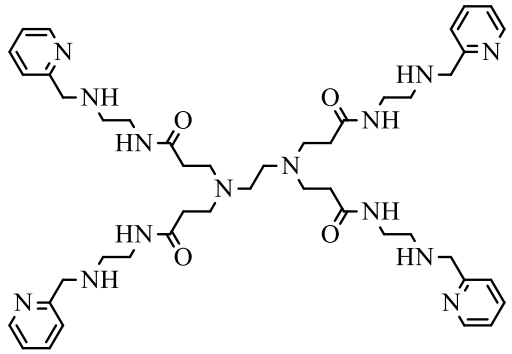


Figura 2. *Estructura de un dendrímero de generación cero funcionalizado con piridilo* [Cervantes-Mejía et al., 2014]

Las porfirinas son macrociclos aromáticos tetrapirrólicos, **Figura 3**, con sustituyentes

laterales y usualmente se encuentran coordinadas a un ion metálico en el centro del macrociclo mediante 4 enlaces covalentes coordinados. Las porfirinas juegan un papel importante en procesos biológicos de plantas y animales que incluyen transferencia electrónica, transporte de oxígeno y oxidación catalítica de sustratos.

Las hemoproteínas como el citocromo *c* peroxidasa (encontrados en micro-organismos con función principal de proteína transportadora de electrones [Maltempo & Moss, 2009]), la peroxidasa de rábano blanco (encontradas en plantas, animales y bacterias con función principal en procesos biológicos de oxido-reducción, respuesta a estrés oxidativo, entre otras [Bohinski, 1991]) y citocromo P-450 (estas enzimas participan en el metabolismo de una variedad de compuestos naturales por reacciones que requieren NADPH y O_2), realizan reacciones que catalizan la reacción de oxidación de un sustrato utilizando el peróxido de hidrógeno generado por los seres vivos como una respuesta de autoprotección [Orellana & Guajardo, 2004].

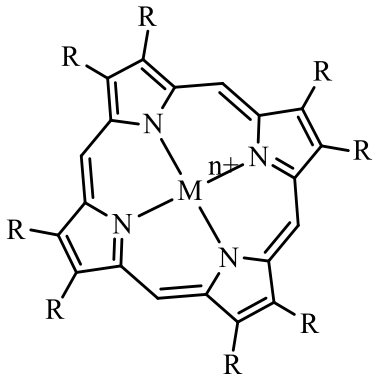


Figura 3. *Metaloporfirinas* [Kadish et al., 2012]

En la década de los ochentas se inició el desarrollo de reacciones de oxidación catalizadas por metaloporfirinas sintéticas. Los científicos han tratado de imitar el sitio activo de diversas hemo-enzimas y hemo-proteínas como catalasas, peroxidasas y citocromos con compuestos de coordinación. Para ello han utilizado específicamente metaloporfirinas sintéticas debido a su similitud con los grupos prostéticos encontrados en estas enzimas que catalizan varias reacciones de oxidación de hidrocarburos con varios donadores de oxígeno como son peróxidos, perácidos, ozono, etc. [Reyes-Ortega, 1998; Sánchez-Sandoval et al., 2003]. Las metaloporfirinas con Fe(II) se han usado como modelos de hemoglobina y mioglobina, como transportadoras de oxígeno en el proceso de respiración [Perutz &

Kendrew, 1962].

Por lo anterior, en este trabajo de investigación se llevó a cabo la reacción entre el ligante **tpe** con la porfirina **pp-Fe(III)**, **Figura 4**. El producto obtenido se caracterizó mediante estudios electrónicos (UV-Vis e IR), magnéticos (^{1}H-RMN, RPE) y cinéticos de actividad antioxidante de peroxidasa utilizando la prueba de guayacol de peroxidasas y el método de DPPH de radicales libres.

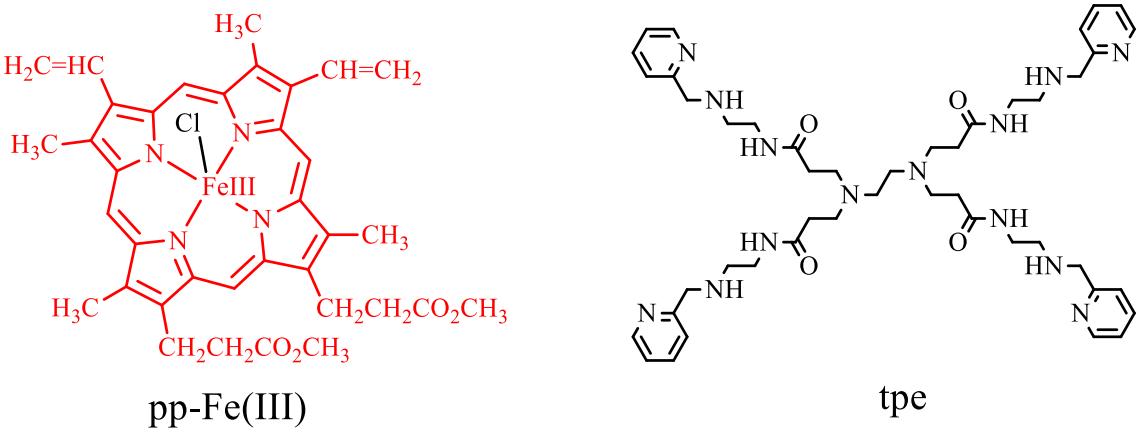


Figura 4. *Clorodimetilésterprotoporfirinato-Fe(III) y el ligante tpe* [Cervantes-Mejía et al., 2014]

1.2 Antecedentes

1.2.1 Porfirinas

Las porfirinas son macrociclos tetrapirrólicos aromáticos con sustituyentes laterales **Figura 3**. Existen 15 isómeros de protoporfirina, pero en la naturaleza solo se encuentra el isómero IX. De este grupo se derivan la hemoglobina, mioglobina y citocromos [Kadish et al., 2012]. En la **Figura 5** se puede observar la estructura de la protoporfirina-IX con los grupos vinilo en las posiciones 2 y 4 del anillo porfirínico, los grupos metilo en las posiciones 1,3,5,8 y los grupos ácido propiónico-3-ilo en las posiciones 6 y 7, a diferencia de la deuteroporfirina y mesoporfirina que en las posiciones 2 y 4 tienen H y grupos -CH_2-CH_3 respectivamente.

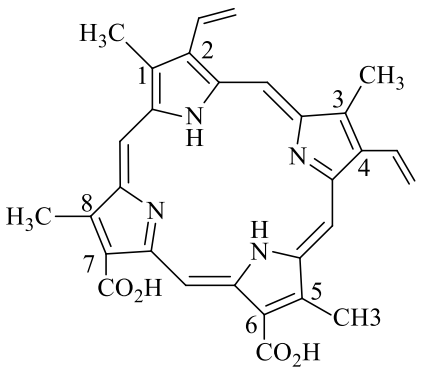


Figura 5. *Estructura de la protoporfirina IX* [Kadish et al., 2012]

La metalo porfirina permite la deslocalización de los electrones *d* del ion Fe(III) dentro del sistema π. Esto cambia la naturaleza del Fe(III) en términos de flexibilidad del sitio central de coordinación, energías de reactividad y su función en transferencia electrónica. Por ejemplo, permite que el Fe(III) presente una mezcla cuántica de estados de espín, $s = 3/2$, 5/2 [Maltempo, 1974].

Los cuatro estados de espín para los 5 electrones *d* del Fe(III) en estos compuestos se han establecido como: alto espín puro $s = 5/2$, bajo espín puro $s = 1/2$, térmicamente mezclado $s = 5/2$, 1/2 y cuánticamente mezclado, $s = 5/2$, 3/2 [Maltempo & Moss, 2009] .

Los derivados de porfirina juegan un papel importante en la bioquímica de todos los sistemas vivos. Algunos de los mejores ejemplos son las porfirinas que contienen Fe(III) o Fe(II) y que se encuentran como grupos hemo de la hemoglobina y la porfirina reducida que contiene magnesio encontrada en la clorofila. Sin porfirinas y sus compuestos derivados la vida como la conocemos sería imposible; y por lo tanto, el conocimiento de estos sistemas es esencial para comprender una amplia variedad de procesos biológicos, incluida la unión del oxígeno a compuestos de este tipo, la transferencia de electrones, la catálisis y el paso fotoquímico inicial en la fotosíntesis [Frydman et al., 1979; Giovannetti, 2012].

1.2.2 Potencial redox

El potencial redox es una propiedad fisicoquímica que presentan las especies químicas o disoluciones donde se encuentran presentes solutos capaces de intercambiar espontáneamente electrones con un electrodo inerte [Zavala 2008]. Una forma de cuantificar si una sustancia es un agente oxidante o un agente reductor es con el potencial redox. Los

agentes reductores tienen un alto potencial de transferencia de electrones. Los agentes oxidantes tienen un bajo potencial de transferencia de electrones, **Tabla 1**. Un potencial positivo implica que el electrodo gana electrones por lo que se reduce, y un potencial negativo implica que el electrodo pierde electrones por lo que se oxida [Harris C.D., 2007].

Tabla 1. *Proceso catódico de reducción [Harris C.D., 2007]*

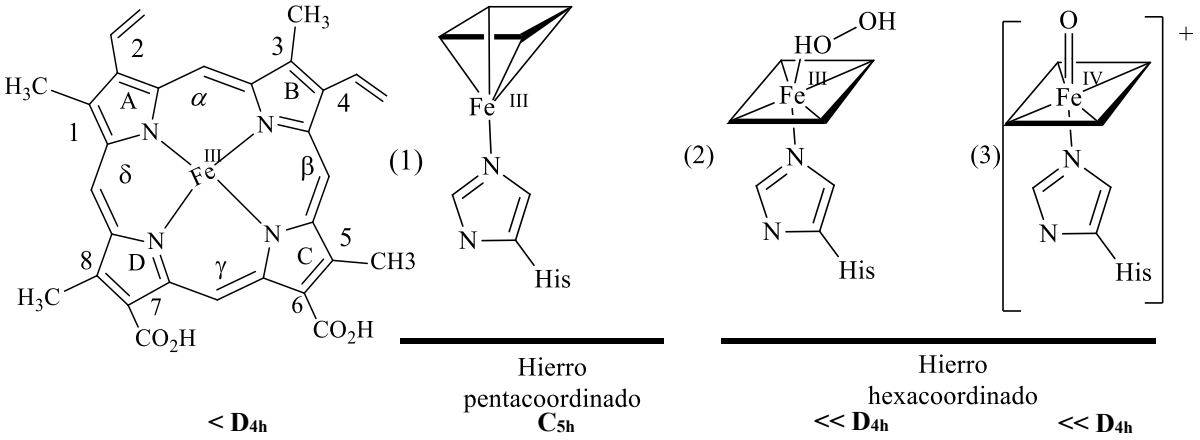
↓ Poder oxidante ↓

Ag.Oxidante + ne⁻ → Ag. Reductor		
Electrodo	Proceso catódico de reducción	E° (Voltios)
$Fe^{(III)}/ Fe^{(II)}$	$Fe^{(III)}_{(ac)} + e^- \rightarrow Fe^{(II)}_{(ac)}$	+0.77
$H^{(I)}/H_2(Pt)$	$2H^{(I)} + 2e^- \rightarrow H_{2(g)}$	0.00
$Fe^{(II)}/ Fe$	$Fe^{(II)}_{(ac)} + 2e^- \rightarrow Fe_{(s)}$	-0.44

↑ Poder reductor ↑

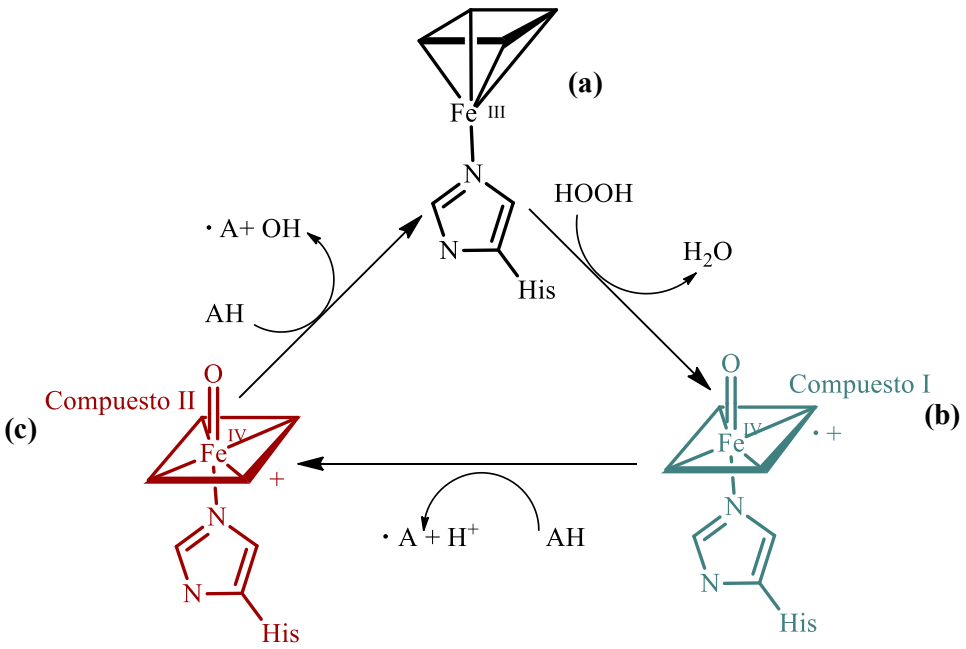
1.2.3 Peroxidasas

Las peroxidasas, son hemoproteínas con actividad catalítica. En su centro activo presentan un grupo hemo que contiene un ion Fe(III). Las peroxidasas catalizan la oxidación de compuestos como fenoles, aminas aromáticas, etc., **Esquema 1**, [Kadish et al., 2012].



Esquema 1. *Sitio activo de la peroxidasa* [Ruiz-Dueñas, 1998]

Las peroxidasas utilizan hidroperóxidos, incluyendo H_2O_2, como aceptores de electrones para catalizar un gran número de reacciones oxidativas. La mayoría muestra el mecanismo de reacción del **Esquema 2**:



Esquema 2. *Mecanismo de reacción del sitio activo de la peroxidasa. a) sitio activo en estado de reposo; b) oxidación del sitio activo y formación del radical π catiónico ferrilo; c) reducción del radical π catiónico ferrilo a catión ferrilo* [Ruiz-Dueñas, 1998]

La enzima reacciona con un equivalente de H_2O_2 para dar lugar al Compuesto I implicando una reacción de óxido-reducción de un electrón en la que el H_2O_2 es reducido a H_2O y la enzima es oxidada al radical π catión ferrilo Fe(IV) formando el Compuesto I. Dos equivalentes oxidantes residen en el intermediario radical π-catiónico oxoferrilo $(Fe^{(IV)}=O)^{\cdot+}$ uno de ellos reside en el Fe(IV) y el otro equivalente, reside en la porfirina en la mayoría de las peroxidasas. El Compuesto I puede oxidar a un equivalente de sustrato mediante una reacción de transferencia electrónica del sustrato al anillo porfirínico que junto con el electrón desapareado deslocalizado en el anillo porfirínico forma el Compuesto II que es un catión ferrilo $[Fe^{(IV)}=O]^{+}$ coordinado con la porfirina que ha recuperado su electrón. Finalmente , el catión ferrilo $[Fe^{(IV)}=O]^{+}$ del Compuesto II es reducido a la forma férrica Fe(III) mediante la substración de un electrón de otra molécula de sustrato, así el ciclo peroxidasa oxida. En ausencia de sustratos reductores que restituyan a la peroxidasa a su estado basal, un exceso de H_2O_2 reacciona con el Compuesto II para formar el Compuesto III inactivando la enzima y destruyendo el grupo hemo (autooxidación de la enzima) [Ruiz-Dueñas, 1998].

La primera enzima biológica reconocida con un sistema de ecm fue el ferricitocromo *c* peroxidasa reportada por Maltempo *et al.*, [Maltempo & Moss, 2009]. En algunos

compuestos biológicos como el ferricitocromo *c*, la peroxidasa de rábano blanco y el ion férrico en complejos de simetría tetragonal, el estado basal es compuesto por una combinación lineal de dos estados de espín $s = 5/2, 3/2$ [Hernández-Anzaldo et al., 2016].

La función de las peroxidasas es utilizar el exceso del H_2O_2 que los organismos vivos sintetizan como autodefensa, para realizar reacciones de oxidación de sustratos, convirtiéndolos en moléculas que el organismo requiere.

1.2.4. Porfirinas-pinza

El diseño de dendrímeros porfirínicos se inspiró en las estructuras únicas de las proteínas cuyos centros activos son hemoproteínas. Tales microambientes, están protegidos para que los centros de metalohemo funcionen correctamente [Li & Aida, 2009]. El estado de alto espín puro $s = 5/2$ del Fe(III) pentacoordinado de las porfirinas se obtiene cuando un ligante de campo débil está axialmente coordinado al hierro-hemo. El ligante de campo débil produce la contracción del anillo porfirínico y el desplazamiento del ion Fe(III) fuera del plano axial hemo. Es considerado que los estados de espín cuánticamente mezclados pueden ser obtenidos por la coordinación selectiva de la cadena de ligantes de porfirina-pinza de campo débil, donde la longitud de la cadena entre las dos cabezas de piridilos que se coordinan axialmente a la porfirina Fe(III), controla la fuerza de coordinación. Esto afecta la distorsión y el desplazamiento del ion metálico del plano del hemo [León-García, 2005].

Se consideran de gran importancia los modelos de síntesis de complejos hexacoordinados porfirinato-Fe(III) que poseen ecm porque pueden mostrar actividad catalítica como peroxidasa [Reyes-Ortega, 1998].

Los estudios realizados por Dolman y colaboradores en 1975 de la peroxidasa de rábano blanco arrojaron una constante de velocidad máxima teórica de $1.8X10^7$ $M^{-1}s^{-1}$ [Dolman et al., 1975]. Posteriormente en 1982 Traylor *et al.*, sintetizaron al protohemin monometilestermono-*Z*[l-imidazolil]propilamida en donde las pruebas cinéticas arrojaron una constante de velocidad máxima teórica de $7.6X10^{-3}$ $M^{-1}s^{-1}$.

Es por eso que en este equipo de trabajo se realizaron estudios para mimetizar el sitio activo de la peroxidasa de rábano blanco. Los primeros compuestos de coordinación meso, deutero y protoporfirinato- Fe(III) coordinados al ligante 1,9-bis(2´-piridil)-2,5,8

triazanonano, con 9 átomos entre los piridilos terminales, **picdien**, fueron reportados por Reyes-Ortega y colaboradores en 1998, en donde se obtuvieron constantes de velocidad máxima teórica de $4.37X10^5$ $M^{-1}s^{-1}$, $9.05X10^4$ $M^{-1}s^{-1}$ y $7.62X10^6$ $M^{-1}s^{-1}$ respectivamente. Se pudo cuantificar que la constante de velocidad máxima teórica para el compuesto con protoporfirina, mostró un valor de un orden de magnitud menor que la reportada para peroxidasa de rábano blanco. Lo anterior debido a que en el sitio activo de la peroxidasa se encuentra presente el protoporfirinato-Fe(III), obteniéndose mejores constantes para los compuesto de coordinación con protoporfirina [Reyes-Ortega et al., 1998; Reyes-Ortega, 1998].

Posteriormente González-Coronel y Reyes-Ortega (Tesis de licenciatura) reportaron compuestos de coordinación con el ligante 1,9-bis(2´-piridil)-2,8-diazaoctano, **picpenta**, del mismo tamaño de cadena que el picdien pero carece de un átomo de nitrógeno intermedio en la cadena, dió una constante de velocidad máxima teórica de $2.0X10^4$ $M^{-1}s^{-1}$, para el compuesto con protoporfirinato-Fe(III), que es tres órdenes de magnitud menor que para la peroxidasa de rábano blanco [González-Coronel, 2002].

Sánchez-Sandoval y colaboradores reportaron compuestos de coordinación con los ligantes 1,7-bis(2´-piridil)-2,6-diazoheptano, **picpropilen**, y 1,11-bis(2´-piridil)-2,6,10-triazaundecano, **picdipropilen**, que para los compuestos con protoporfirinato-Fe(III) dieron valores de constantes de velocidad máxima teórica de $9.11X10^2$ $M^{-1}s^{-1}$ y $1.01X10^3$ $M^{-1}s^{-1}$, respectivamente, que son cinco y cuatro órdenes de magnitud menores que la actividad de la peroxidasa de rábano blanco [Sánchez-Sandoval et al., 2003].

Arroyo y colaboradores reportaron compuestos de coordinación con [(1,12-bis(2´-piridil)-2,11-diazadodecano)(protoporfirinato)]Fe(III), **picocta**, cuantificándose la constante de velocidad máxima teórica de $4.58X10^2$ $M^{-1}s^{-1}$, que es cinco ordenes de magnitud menor que para la peroxidasa de rábano blanco [Arroyo-Abad, 2007].

1.3 Justificación

Las porfirinas tienen funciones interesantes en los sistemas biológicos ya que actúan como grupo prostético en las enzimas y realizan reacciones de catálisis de forma eficiente y con una gran selectividad en los organismos vivos. Por lo anterior se propone mimetizar al centro activo de las peroxidasas a través de un compuesto modelo para comprender los

mecanismos de reacción de estas enzimas y comprobarlo con UV-Vis, IR, RMN-^{1}H y RPE [Reyes-Ortega, 1998].

1.4 Hipótesis

Es posible obtener un nuevo compuesto de la familia porfirina-pinza a partir de la reacción de pp-Fe(III) y el ligante tpe, que mimetice estructural y cinéticamente al centro activo de las enzimas peroxidasa y muestre la existencia de especies de Fe(III) con espín cuánticamente mezclado, s = 3/2, 5/2, tal como se presenta para la peroxidasa de rábano (HRP), y comprobar que el porcentaje de la especie con mayor s = 3/2 en la mezcla cuántica de estados de espín determina la actividad peroxidasa.

1.5 Objetivo General

Establecer las condiciones de reacción para sintetizar un nuevo compuesto de coordinación, caracterizarlo espectroscópicamente por UV-Vis, IR, RMN-^{1}H y RPE, determinar su comportamiento como peroxidasa y antioxidante y realizar la cinética enzimática para obtener los valores de la constante de velocidad máxima teórica k_{cat} y las constantes de Michaelis-Menten, $K_{H_2O_2}$ y $K_{guayacol}$.

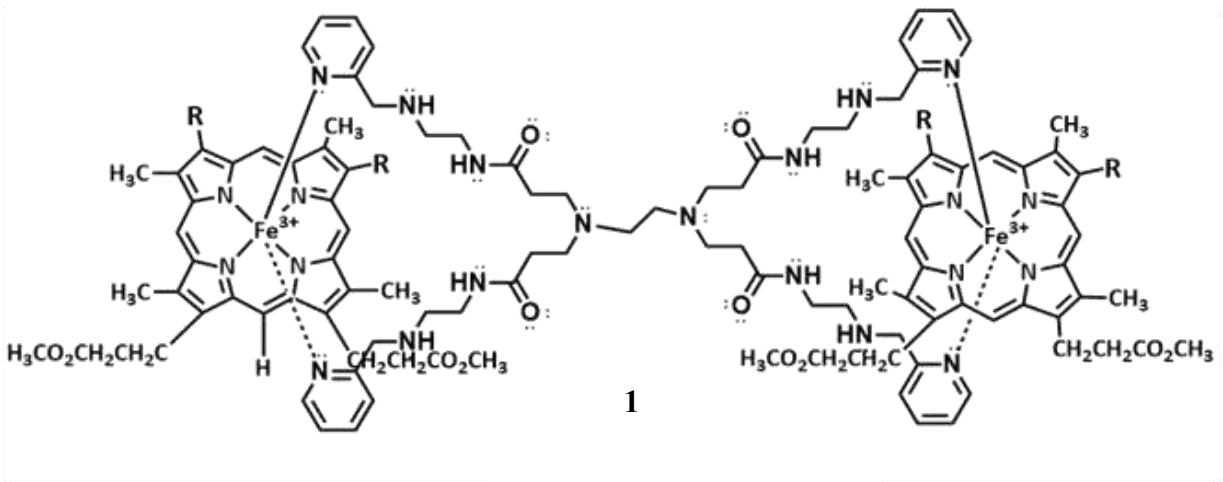
1.5.1 Objetivos Específicos

- Obtener el compuesto de coordinación **1** a partir de pp-Fe(III) y el ligante tpe, por la metodología de Reyes-Ortega *et al.*
- Realizar los estudios electrónicos (UV-Vis e IR) y magnéticos (RMN-^{1}H y RPE) de **1**.
- Cuantificar en los espectros de RPE los porcentajes de especies de Fe(III) con ecm presentes y calcular en cada especie los porcentajes de s = 3/2 y s = 5/2.
- Obtener el espectro de RPE de la formación del Compuesto I, característico de las peroxidasas, haciendo reaccionar **1** con H_2O_2.
- Comprobar que **1** presenta actividad como peroxidasa, haciendo reaccionar **1** con guayacol y H_2O_2.

- Comprobar que **1** presenta el comportamiento Michaelis-Menten de enzimas obteniendo los perfiles de comportamiento.
- Determinar los valores de la constante de velocidad máxima teórica k_{cat} y las constantes de Michaelis-Menten, $K_{H_2O_2}$ y $K_{Guayacol}$.
- Describir la actividad antioxidante de **1** mediante la prueba con DPPH.

CAPÍTULO II

Metodología



1

2. Metodología

2.1 Síntesis de **1**

Se disolvieron 0.015g (0.023 mM) de clorodimetilésterprotoporfirinato-Fe(III) en 1L de metanol y el sólido se mantuvo con agitación hasta su disolución total después de 12 horas, después se filtró a vacío con papel filtro Whatman 2 para eliminar la porfirina no disuelta y se aforó con metanol; posteriormente se le agregaron 0.017g (0.019 mM) de tpe y se dejó agitar la muestra por 6 horas más para asegurar la formación de **1**, **Figura 6**. La concentración de la disolución de **1** que se obtuvo fue de 0.008 mM. UV-Vis $\lambda_{máx}$ 262 nm (tpe), 356 nm (banda de transferencia de carga), 399 nm (banda Soret), 479 nm y 596 nm (bandas Q). IR 3435.3 (*st* N-H $_{\text{pirrol}}$), 2924 (*st* C-H $_{\beta\ \text{pirrol}}$), 1462 (*st* C=C), 670 (δCCN) cm^{-1}. RMN de ^1H, δ= 74.22, 73.09, 70.13, 65.27 (4 Me-hemo), 56.58 (α-CH_2), -35.62 (meso-H) ppm. RPE muestra dos especies de Fe(III), A_1 y B_1, con $g_{\perp}^{A} = 5.62$ y $g_{\parallel}^{A} = 1.99$, $g_{\perp}^{B} = 4.26$ y $g_{\parallel}^{B} = 2.10$. Constante de velocidad máxima teórica $k_{cat} = 5.38x10^4\ M^{-1}s^{-1}$, y las constantes de Michaelis -Menten con valores de $K_{Guayacol} = 1.58x10^{-4}M$ y $K_{H_2O_2} = 2.8x10^{-1}M$.

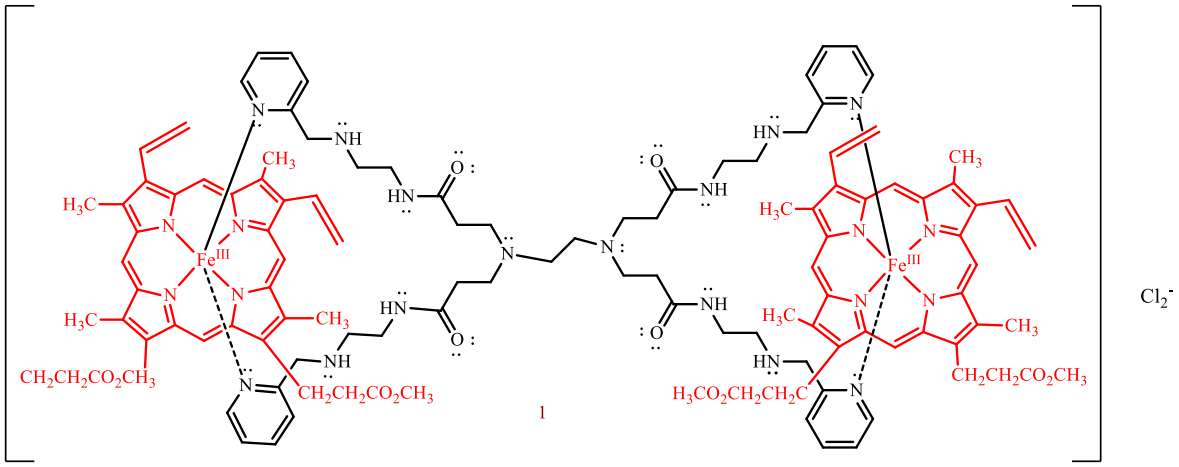


Figura 6. *Estructura propuesta de **1***

2.2 Instrumentos, condiciones y materiales

2.2.1 Estudios espectroscópicos

UV-Vis

Para comprobar la formación de **1** se usó el espectrofotómetro UV-Vis-DR 5000. Se

ocupó como disolvente metanol. Las mediciones de 200-800 nm se hicieron a temperatura ambiente y con concentración aproximada de 0.008 - 0.002 mM, en celdas de cuarzo con 1 cm de longitud.

IR

Se usó el espectrofotómetro de infrarrojo IR-FTS 3000 MX para comprobar que se formara **1** mediante el análisis de las bandas de vibración observadas en el espectro. Se ocupó como disolvente metanol y cloroformo. Las mediciones de 400-4000 cm^{-1} se hicieron a temperatura ambiente a concentración aproximada de 0.008 mM en pastillas de KBr.

RMN

Se hicieron los espectros en disolución de concentración aproximada de 0.1 mM de **1** con metanol deuterado, usando TMS como referencia. Se usó el espectrofotómetro BRUKER AVANCE III de 500 MHz, temperatura de 296 K, la amplitud del campo fue de -100 a +100 ppm, número de scans 4096 y tiempo de 19.41 h.

RPE

Se caracterizó por RPE a **1** y su precursor pp-Fe(III) en el espectrofotómetro BRUKER ELEXYS-500-II en el Laboratorio de Mediciones Magnéticas y Biofísica de la ESFM del IPN, para obtener sus espectros en banda-X a temperatura de 90 y 77 K en disoluciones de metanol de concentración aproximada de 0.1mM y frecuencia de 9.4 GHz. El agua, alcoholes y otros disolventes de constante dieléctrica alta no son los disolventes de elección para RPE porque absorben fuertemente la radiación de microondas.

2.3 Actividad antioxidante

2.3.1 Actividad antioxidante por método del DPPH

La donación de hidrógeno o la habilidad de ceder radicales de **1** fue evaluada usando el radical estable DPPH. Este radical tiene una absorción característica de $\lambda_{máx.}$ = 515 nm en metanol. Se utilizó una concentración final de DPPH de 0.23 mM en metanol. Se realizó la disolución de **1** con concentración de 0.008 mM en 2.98 mL de metanol y se le adicionaron 20 µL de la disolución de DPPH para completar un volumen total de 3 mL. Se midió la $\lambda_{máx.}$ = 515 nm, característica del radical del DPPH en el espectrofotómetro de UV-Vis de 200 -

800 nm donde se observó cuanto disminuía esta banda característica del DPPH.

2.3.2 Actividad antioxidante de peroxidasa

Se realizaron pruebas por espectroscopía UV-Vis, en celdas de cuarzo de disoluciones metanólicas de:

a) guayacol con H_2O_2 y b) guayacol con **1** c) **1** con H_2O_2

Para ver la posible formación de los POG sin la participación de un tercer reactante, se mezclaron los dos reactivos en la celda de cuarzo y se corrieron los espectros de UV-Vis sucesivamente en un intervalo de 200-800 nm. Se realizó una prueba cualitativa en un vial con **1** y H_2O_2 para observar la formación de los intermediarios Compuestos I y II por el cambio de coloración. Se realizó la reacción de **1** + H_2O_2 + guayacol, y se midió la actividad peroxidasa de **1** por la aparición de $\lambda_{máx}$ indicativa de la formación POG. Las concentraciones utilizadas se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. *Concentraciones utilizadas para la reacción de actividad antioxidante*

1, mM	H_2O_2, mM	Guayacol, mM
0.008	12.5	0.073

2.3.3 Estudios cinéticos de **1**

Para realizar las mediciones cinéticas, en una celda de cuarzo con tapón de teflón se mezclan 3 mL de la disolución de **1** con la disolución de guayacol. Se tapa la celda, se agita y se introduce en el carrusel de celdas del espectrofotómetro de UV-Vis. Esto se realiza en series de 6 celdas. Luego de colocar la sexta celda, se adiciona cierta cantidad de la disolución de H_2O_2 a la primera celda e inmediatamente se agita vigorosamente la disolución de forma manual, para introducir esta disolución al equipo de UV-Vis e iniciar la medición. Las reacciones son medidas durante los primeros 20 s a temperatura ambiente con ayuda del software de cinética del equipo de UV-Vis. Para comprobar el comportamiento de Michaelis-Menten se midió la velocidad inicial (v_0) tomada en un intervalo de tiempo de reacción de 15 s y variando la concentración de cada uno de los reactantes. Estas concentraciones variables se aumentaron hasta comprobar si hay o no saturación en los sitios activos de la enzima a estudiar. Primero, se varió la concentración de **1** de 0.008 - 0.003 mM y se mantuvieron

constantes las concentraciones del guayacol ~ 0.073 mM y de H_2O_2 ~ 42 mM. Segundo, se varió la concentración del guayacol de 0.020 - 0.13 mM manteniendo constantes las concentraciones de **1** ~ 0.008 mM y el H_2O_2 ~ 42 mM. Finalmente se varió la concentración de H_2O_2 de 14 – 84 mM y se mantuvieron constantes las concentraciones de **1** y del guayacol. Cada una de las concentraciones de los reactivos que se variaron, se repitieron un mínimo de 10 veces para la cuantificación de v_0, Apéndice A [León-García, 2005; Reyes-Ortega, 1998].

Para realizar la medición de los parámetros cinéticos de **1**; a partir de las gráficas de Michaelis-Menten se elige una adecuada concentración de **1**, 10 concentraciones de H_2O_2 y 3 concentraciones de guayacol que ayudarán en la determinación de los parámetros cinéticos. Para la selección del intervalo de las concentraciones de H_2O_2, se eligió un intervalo en el que se observa una dependencia de la velocidad inicial con la concentración de H_2O_2. Para la selección de las concentraciones del guayacol fue importante que estas concentraciones se encontraran en la zona asintótica de las curvas del comportamiento Michaelis-Menten y debido a que se observan dos zonas asintóticas, se tomó la primera zona. De este modo, se hizo independiente la velocidad inicial de la concentración de guayacol y se vuelve solo dependiente de la variación de la [H_2O_2]. Las concentraciones utilizadas en este estudio se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. *Concentraciones de **1**, guayacol y H_2O_2 para la determinación de los parámetros cinéticos*

compuesto	$[compuesto]_f$, mM	$[Guayacol]_f$, mM	$[H_2O_2]_f$, mM
1	0.008	0.063- 0.09045	12.5-100

2.4 Tratamiento estadístico

2.4.1 Tratamiento estadístico de datos de **1**

Las mediciones experimentales siempre tienen variabilidad y errores, por lo que las mediciones deben ser tratadas estadísticamente para que sean válidas. La estadística nos proporciona herramientas para aceptar datos que tienen una alta probabilidad de ser correctos y de rechazar los datos que no lo son [Harris C.D., 2007]. Dean y Dixon dan un procedimiento estadístico que permite estimar un valor central y definir límites de confianza sobre un conjunto dado de n datos u observaciones; donde $n \leq 10$; es decir, este tratamiento estadístico

se usa para el estudio de poblaciones pequeñas [León-García, 2005].

La prueba Q opera de la siguiente manera:

Se calcula la distancia de una observación dudosa (x_n) desde su vecino más cercano (x_{n-1}), luego se divide esta distancia por el intervalo R que es la diferencia entre el valor más grande y el más pequeño de los datos analizados, **Ecuación 1**.

$$Q = \frac{X_n - X_{n-1}}{R} \qquad \textbf{Ecuación 1}$$

Si el valor calculado excede el valor tabulado de Q de Dean y Dixon, la observación cuestionable puede ser eliminada con un 90% de confianza, **Tabla 4**.

Dixon investigó el funcionamiento de varias pruebas estadísticas en términos de su habilidad para rechazar valores malos en conjuntos de datos tomados de poblaciones Gaussianas. Las pruebas investigadas incluyen aquellas que requieren el conocimiento de σ (desviación estándar) o s (varianza) y aquellas que no requieren tal información. Dixon concluyó que las pruebas basadas en proporción del intervalo y diversos subintervalos fueron preferidos como resultado de su excelente rendimiento y facilidad de cálculo [Dean & Dixon, 1951].

Los niveles de confianza comúnmente usados para las pruebas que involucran al rechazo de datos son del 99%, 95% o 90%. Cuando se opera al 90% de nivel de confianza ($\alpha = 0.10$), 10% de los buenos valores serán rechazados, **Tabla 4** [Rorabacher, 1991].

Tabla 4. *Valores Críticos de Dixon´s r_{10} (Q)*[Rorabacher, 1991]

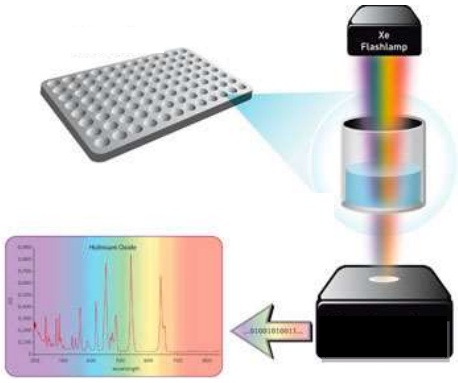
Nivel de confianza			
# de muestra	80% ($\alpha = 0.20$)	90% ($\alpha = 0.10$)	95% ($\alpha = 0.05$)
5	0.557	0.642	0.710
6	0.482	0.560	0.625
7	0.434	0.507	0.568
8	0.399	0.468	0.526
9	0.370	0.437	0.493
10	0.349	0.412	0.466
11	0.332	0.392	0.444
12	0.318	0.376	0.426

* r_{10}, simplemente compara la diferencia entre un solo valor sospechoso (x_1 o x_n) y su valor vecino más cercano al rango general de valores en la muestra; en otras palabras, determina la fracción del rango total que es atribuible a un sospechoso valor atípico

Las mediciones de velocidad inicial se trataron estadísticamente seleccionando los valores más precisos mediante la prueba Q. La medición se realizó 12 veces para cada concentración para tener así al menos 6 datos de alta precisión. Los datos aceptados mediante la prueba Q se trataron estadísticamente para obtener su promedio y desviación estándar. El promedio se tomó como la velocidad inicial (v_0) y la desviación estándar como el error de la medición [León-García, 2005].

CAPÍTULO III

Síntesis y caracterización espectroscópica de 1



3. Resultados y discusión de 1

3.1 Espectroscopía UV-Vis

La espectroscopía de emisión de fotones, UV-Vis, analiza en longitudes de onda en el intervalo de 150 – 1200 nm; utiliza radiación electromagnética de las regiones visible, ultravioleta lejano e infrarrojo cercano. La absorción de la radiación electromagnética en estas regiones por una muestra produce la excitación del electrón de un orbital molecular de más alta energía ocupado (HOMO) a un orbital de más baja energía desocupado (LUMO) [Pavia et al., 2001]. Las bandas de absorción en ultravioleta y visible que presentan los compuestos se asocian con transiciones electrónicas, las transiciones que se pueden observar son las correspondientes a orbitales σ y σ^* los cuales están localizados a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Los orbitales σ son cilíndricamente simétricos respecto al eje internuclear generando una densidad electrónica elevada en esta región y son análogos a un orbital *s*, que es el orbital atómico de mayor simetría, son los orbitales ocupados de más baja energía y tienen un carácter fuertemente enlazante. Se forman, de acuerdo a la teoría de orbitales moleculares (OM) por la suma y resta de frecuencias de onda de los orbitales atómicos de los átomos que forman el enlace [Huheey et al., 1997]. Si el eje internuclear se encuentra en un plano nodal, se produce el enlace π. Estos son OM muy parecidos a los orbitales atómicos (OA) *p*. Se forman por la suma y resta de OA *p*, siempre y cuando no sea frontal su mezcla. En los enlaces δ, son una combinación lineal de OA (suma y resta), el eje internuclear se encuentra en dos planos nodales, perpendiculares entre sí [Huheey et al., 1997]. Los orbitales σ^*, como todos los orbitales antienlazantes, resta de OA *s*, *p* frontales o *d* frontales, presentan un plano nodal perpendicular al eje del enlace en la región internuclear. Orbitales de más alta energía son π y su correspondiente π^* y se emplean en enlaces múltiples. Las regiones de mayor densidad electrónica correspondiente a los π son aquellas colaterales al eje del enlace. El carácter enlazante o antienlazante de los orbitales π tiene menos densidad que el de los orbitales σ. Esto se cuantifica con la integral de traslape (modelo enlace valencia y por la energía del enlace, más o menos negativa cuando se forma). Orbitales *n* tienen pares electrónicos sin compartir y describen pares electrónicos libres asociados con heteroátomos (O, S, N…) tiene incluso energía más alta que los orbitales σ y π. Los orbitales de antienlace son los orbitales de más alta energía en un diagrama de OM **Figura 8** [Pavia et

al., 2001].

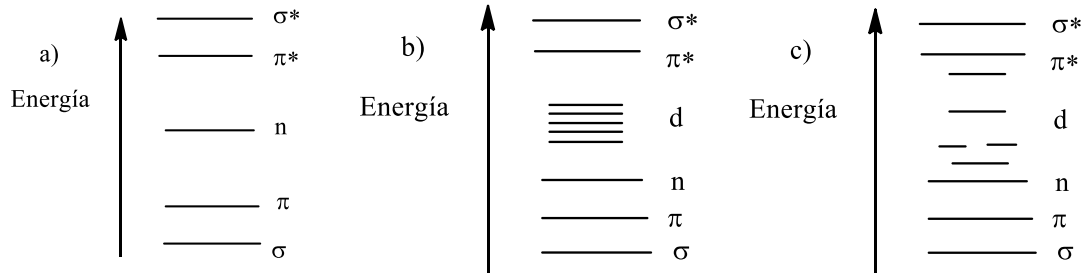


Figura 8. *Niveles de energía de los estados electrónicos, a) desdoblamiento energético del tpe, b) desdoblamiento energético de pp-Fe(III), c) desdoblamiento energético de* ***1*** [Pavia et al., 2001]

La teoría de grupos se puede usar en la generación de combinaciones de simetría. Si se dan un conjunto de orbitales o funciones matemáticas pertenecientes a una molécula usando el concepto de simetría únicamente, con la teoría de grupos se puede construir una combinación de las simetrías de OA (conjunto base) que lleven a establecer la simetría de la molécula.

Los requerimientos mecánico-cuánticos para que la materia absorba energía son resumidos por las reglas de selección. La intensidad integrada *f* de una banda de absorción es la relacionada con el valor de la integral de momento de transición teórico como sigue, **Ecuación 2**:

$$f \propto \int_{-\infty}^{+\infty} \left| \psi_{el} \widehat{M} \psi_{el^{ex}} dv \right|^2 = \mathbf{D} \qquad \textbf{Ecuación 2}$$

Donde **D** es la fuerza del oscilador, ψ_{el} y $\psi_{el^{ex}}$ son las funciones de onda electrónicas para los estados basal y excitado del electrón, respectivamente. $\widehat{M}$ es el operador de momento dipolar eléctrico con componentes $\overline{M_x}$, $\overline{M_y}$ y $\overline{M_z}$. Y la integral entera es referida como la integral de momento de transición, que si toma un valor ≠ 0, la transición es permitida, si es igual a cero, está prohibida y no habrá transición [Russell & Box, 1992].

Las reglas de selección para UV-Vis que nos ayudan a predecir si una transición es permitida o no, son las siguientes:

La primera regla de selección para las moléculas con centro de simetría establece que las transiciones permitidas son la que van de $g \rightarrow u$ o de $u \rightarrow g$ pero de $g \rightarrow g$ o de $u \rightarrow u$ son prohibidas. Por lo tanto, las transiciones *d-d* que van de $g \rightarrow g$ son prohibidas por regla de selección.

La segunda regla expresa que las transiciones entre estados de diferente multiplicidad de espín electrónico son prohibidas; es decir, el espín del electrón no puede tener un cambio de dirección porque eso requeriría de una mayor energía absorbida.

La tercera regla de selección es para moléculas sin centro de simetría en donde la transición va depender solo de la simetría del estado electrónico inicial y la simetría del estado electrónico final [Russell & Box, 1992].

Sin embargo, las transiciones prohibidas por regla de selección tienen una baja intensidad con respecto a las permitidas puesto que son menos probables y ocurren menos veces [Pavia et al., 2001]. Tratando de explicar este comportamiento se hicieron cálculos teóricos más refinados que incluyeron los efectos del acoplamiento espín-orbita y que predicen bajas intensidades para las transiciones prohibidas. Otro fenómeno que da intensidad a las transiciones prohibidas es el acoplamiento vibracional con la transición [Russell & Box, 1992].

Resultados. En la **Figura 9** se muestra el espectro de UV-Vis de **1** y su precursor clorodimetilésterprotoporfirinato-Fe(III).

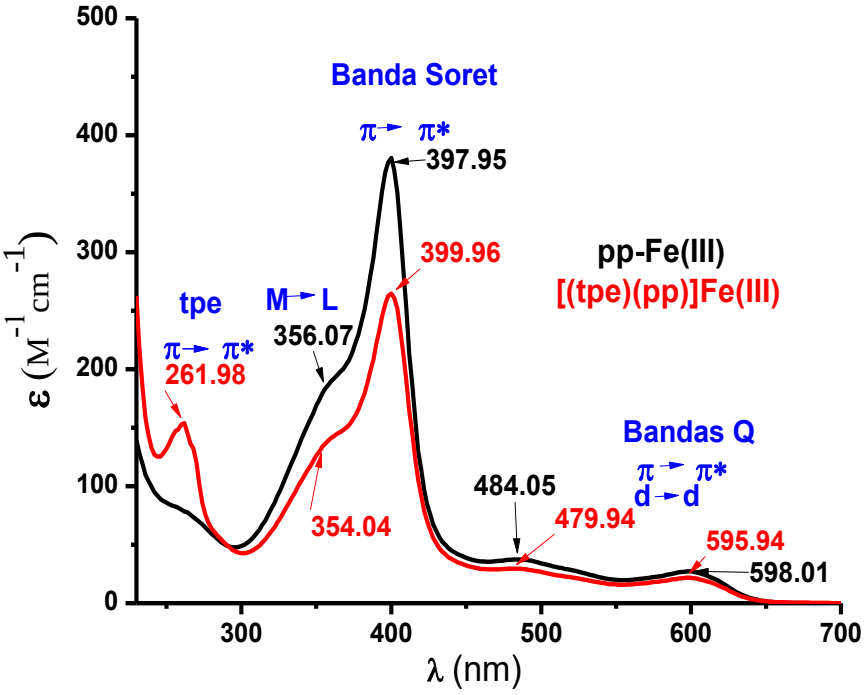


Figura 9. *Espectros de UV-Vis de 1 y* ***pp-Fe(III)***

En los espectros de UV-Vis se observa una banda muy intensa alrededor de los 400 nm

llamada banda Soret y en la región de ~ 480 – 600 nm las bandas *Q*.

Para **1** baja la intensidad de absorción de la banda Soret con respecto a su precursor, pp-Fe(III), y las bandas *Q* se observan a mayores energías, menores longitudes de onda. Las bandas *Q* son características de una simetría ≤ D_{4h} con cierta distorsión en la medida que el Fe(III) esté más o menos cercano al plano de la porfirina [Reyes-Ortega, 1998]. Se observa un hombro a 356.07 nm para **1** y su precursor que se fue asignado a una transición de transferencia de carga M-L [Atkins et al., 2010].

En la **Tabla 5** se resume la información obtenida de los espectros de UV-Vis de **1** y su precursor.

Tabla 5. *Posición de bandas que se observan en los espectros de UV-Vis de pp-Fe(III) y de **1***

Porfirina-Fe(III)	Hombro nm	Soret nm	Banda Q_1 nm	Banda Q_2 nm	ΔQ nm
Protoporfirina-Fe(III)	356.07	397	484	598	114
Protoporfirina-Fe(III)-tpe **(1)**	354.04	399	479	596	117

Discusión. Para comenzar la discusión de los resultados se abordará el tema de teoría de campo cristalino en donde un par de electrones solitarios del ligante es representado como un punto de carga negativa que repele a los electrones en los orbitales *d* del ion metálico central de carga puntual positiva, los 5 orbitales *d* en un ion metálico gaseoso aislado son degenerados. Si se coloca un campo con simetría esférica de cargas negativas en torno al metal, los orbitales siguen siendo degenerados, pero todos ellos aumentan de energía como resultado de la repulsión entre el campo negativo y los electrones negativos en los orbitales. En la materia, la influencia de los ligantes no provoca una simetría completamente esférica y la ruptura de la degeneración de los orbitales *d* produce desdoblamientos con diferentes estados de excitación y ordenamiento energético [Huheey et al., 1997]. La geometría de la estructura alrededor del ión metálico quedará determinada de acuerdo al número de electrones en los orbitales atómicos *d*, del nuevo reordenamiento energético de éstos, de la carga o densidad electrónica de los átomos donadores que los rodean y de la disponibilidad geométrica o espacial de todos los orbitales atómicos que intervienen. Considerando la formación de un complejo octaédrico perfecto; los ligantes ocupan posiciones simétricas sobre los ejes de un sistema de coordenadas cartesianas con el ion metálico en el origen.

Todos los orbitales *d* aumentarán su energía con respecto al ion libre debido a las repulsiones de cargas negativas. Sin embargo, no todos los orbitales resultan afectados en el mismo grado. Los orbitales que se encuentran sobre los ejes (d_{z^2}, $d_{x^2-y^2}$) experimentan una repulsión más fuerte que los orbitales con lóbulos dirigidos entre los ejes (d_{xy}, d_{xz}, d_{yz}). Por lo tanto, los orbitales *d* se dividen en dos conjuntos y los orbitales d_{z^2} y $d_{x^2-y^2}$ tienen mayor energía que los otros tres. Este simple modelo conduce a un diagrama de nivel de energía en el cual los tres orbitales degenerados t_{2g} (d_{xy}, d_{xz}, d_{yz}) se encuentran debajo de los dos orbitales degenerados e_g (d_{z^2}, $d_{z^2-y^2}$), **Figura 10**.

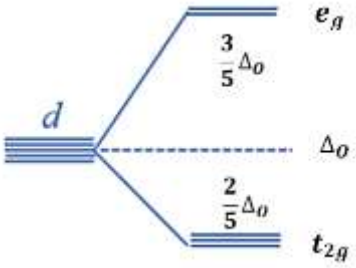


Figura 10. *Desdoblamiento de los orbitales d en un campo octaédrico* [Atkins et al., 2010]

El grado en que los orbitales e_g y t_{2g} se separan en un complejo octaédrico se representa con el llamado parámetro de desdoblamiento de campo-ligante Δ_O; este parámetro varía dependiendo de la naturaleza del ligante (campo débil o fuerte). Los ligantes pueden ser ordenados en una serie espectroquímica, en la cual los miembros son arreglados en orden de incremento de fuerza de campo cuando estos ligantes están presentes en un complejo. Un ligante de campo fuerte es C=O y uno de campo débil es Br [Atkins et al., 2010]. En la **Figura 11** se puede observar la serie espectroquímica de los ligantes y su clasificación entre campo débil y fuerte.

$$I^- < Br^- < Cl^- < F^- < OH^- < C_2O_4^{2-} < H_2O < py < NH_3 < PPh_3 < CN^- < CO$$

Campo débil | Campo fuerte

Figura 11. *Serie espectroquímica de los ligantes*

Martin Gouterman (1973) propuso por primera vez el modelo de cuatro orbitales en la década de 1960 para explicar los espectros de absorción de porfirinas.

El macrociclo de porfirina es una molécula altamente conjugada que contiene 22

electrones π, pero solo 18 electrones son deslocalizados de acuerdo a la regla de Hückel de la aromaticidad ($4n + 2$ electrones π deslocalizados, donde $n = 4$) [Giovannetti, 2012].

De acuerdo con esta teoría, las bandas de absorción en los sistemas de porfirina surgen de transiciones entre dos HOMOs $3a_{2u}$ (π) y $1a_{1u}$ (π) hacia dos LUMOs $4e_g$ (π^*) orbitales degenerados, **Figura 12**; el tipo de centro metálico y los sustituyentes del anillo aromático afectan las energías relativas de estas transiciones. Las transiciones entre estos orbitales $\pi \rightarrow \pi^*$, π^* dieron lugar a dos estados excitados. La mezcla orbital divide estos dos estados de acuerdo con su energía, creando un estado de energía más alto con mayor fuerza de oscilador, dando lugar a la banda Soret o B (400 nm), y un estado de energía más bajo con menos fuerza de oscilador y mezclado con vibraciones, dando lugar a las bandas Q (500-650 nm) que siguen siendo una transición $\pi \rightarrow \pi^*$, **Figura 13**. Longuet-Higgins *et al.*, 1950, fueron los primeros en realizar cálculos de Hückel simple en porfirinas. Los cálculos de Hückel colocan la transición $3a_{2u} \rightarrow 4e_g$ en energía más baja que $1a_{1u} \rightarrow 4e_g$ [Gouterman, 1978; Gouterman et al., 1963; H. C. Longuet-Higgins, C. W. Rector & J. R. Platt, 1950]. El orbital molecular más alto ocupado (HOMO) para tetrapirroles es identificado por el número cuántico de momento angular $l = 4$ que es asociado con un número cuántico principal de $n = 4$ de los 18 electrones π [Stillman et al., 2017].

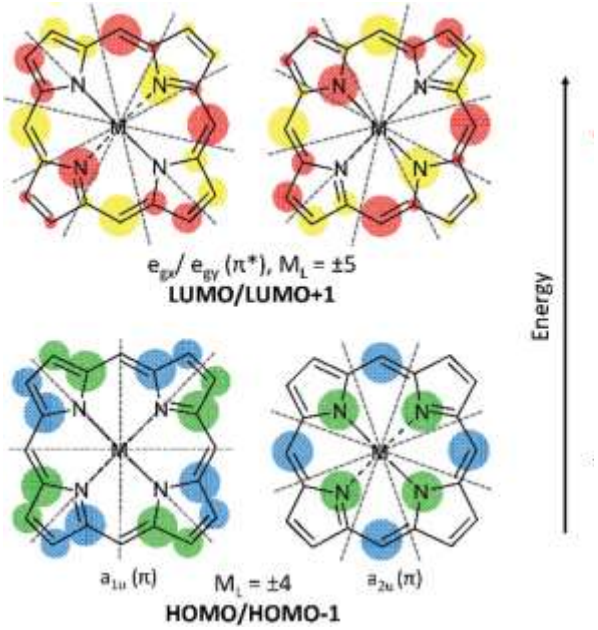


Figura 12. *Orbitales frontera del modelo de Gouterman* [Stillman et al., 2017]

Las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ pueden explicarse considerando los orbitales frontera HOMO

y LUMO. La banda de región azul ($S \rightarrow S_2$), banda Soret se origina de las transiciones permitidas entre los cuatro orbitales, mientras que las bandas de absorción de energía más baja en la región roja ($S \rightarrow S_1$) surgen de transiciones prohibidas mezcladas con transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$, **Figura 13 a)** [Stillman et al., 2017].

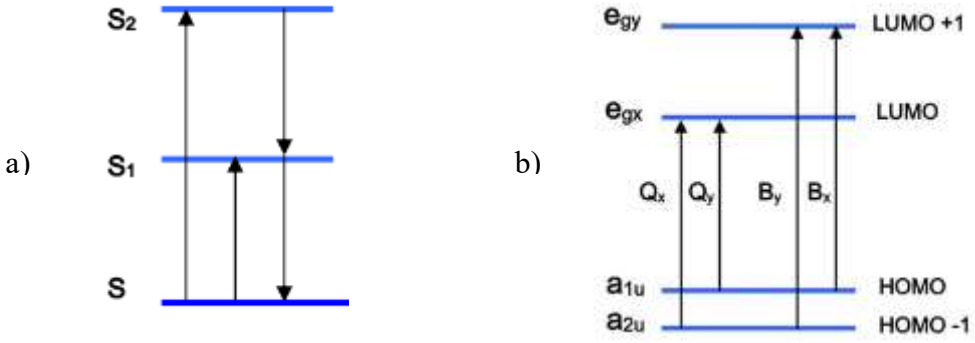


Figura 13. *a) Transiciónes de estados de S_0 a S_1 y S_0 a S_2 y b)Transiciones de porfirina* [Giovannetti, 2012]

El cálculo teórico de Zerner, Gouterman y Kobayashi [Zerner et al., 1966] reporta que las bandas que presentan las porfirinas se deben a un estado singulete excitado con una configuración $a_{1u}e_g$ formado por la promoción de un electrón del orbital a_{1u} a un orbital e_g [Weiss et al., 1965]. Igualmente, un estado singulete con configuración $a_{2u}e_g$ se forma por promoción de un electrón del orbital a_{2u} a un orbital e_g. Estos estados excitados singulete se mezclan con dos nuevos estados singulete.

El primer estudio de Gouterman de los espectros de metalohemos fue con un cálculo extendido de Hückel de los orbitales moleculares de porfirinas complejadas a varios metales de transición [Gouterman, 1978].

El acoplamiento entre los metales de transición y las porfirinas se produce debido a la proximidad en energía de los diversos niveles y el carácter de simetría favorable de los orbitales atómicos. Dentro del límite de fuertes interacciones metal-porfirina, los orbitales moleculares resultantes contendrán mezclas de orbitales de metal y porfirina.

Mientras que todos los cinco niveles de un átomo libre de metal de transición son degenerados (es decir, tienen la misma energía), estos niveles son no degenerados cuando el metal se compleja a una porfirina debido a que los orbitales *d* interactuarán con los orbitales de la porfirina en grados variables, **Figura 14**.

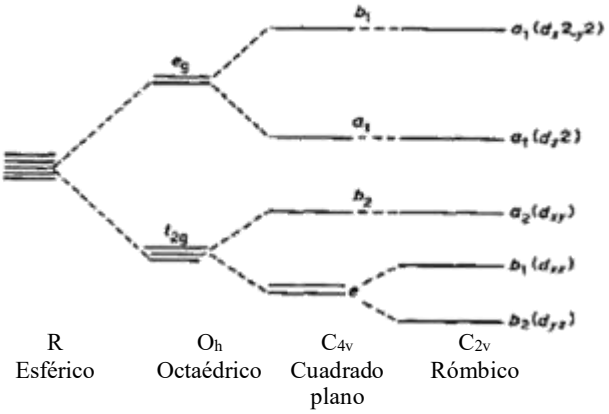
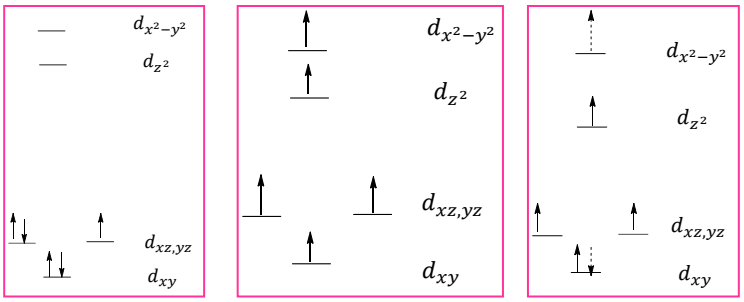


Figura 14. *Desdoblamiento de los orbitales de los electrones d ^{5} del Fe(III) se dividen bajo la influencia de cambios en simetría molecular [Owens & O'Connor, 1988]*

Gouterman realizó posteriormente los cálculos de Hückel de otros complejos de porfirina ferrosa y férrica, y fue capaz de correlacionar el estado de espín con la posición del Fe(III) con respecto al plano de porfirina, y caracterizar el enlace del ligante con respecto a la geometría, ionicidad y estabilidad [Gouterman et al., 1963]. Generalmente, los ligantes de campo alto tienen una fuerte interacción σ y/o π aceptor y una corta longitud de enlace Fe(III)-ligante. Los ligantes de campo bajo son donadores π y σ y tiene una longitud de enlace larga Fe(III)-ligante. Para iones metálicos de estados de espín intermedios se requieren ligantes de campo medio o ligantes débiles, **Figura 11**.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que existe una clase de hemoproteínas en las que los espectros ópticos de las formas férricas son característicamente similares a las proteínas de hemo férrico de alto espín, pero los datos magnéticos muestran claramente que el Fe (III) podría describirse mejor como una mezcla mecánica cuántica de espín, s = 5/2 y s = 3/2, **Figura 15** [Maltempo & Moss, 2009].



s = 1/2 a) s = 5/2 b) s =3/2, 5/2 c)

Figura 15. *Desdoblamiento energético de los orbitales para un octaedro distorsionado con Fe(III) con diferentes estados de espín* [Owens & O'Connor, 1988]. *a) Espín bajo, b) Espín alto y c) ecm, la flecha punteada representa la dualidad de posición del espín electrónico*

Es conocido que varias hemoproteínas, notablemente la peroxidasa de rábano blanco y

mieloperoxidasa, contienen espín cuánticamente mezclado [Gouterman, 1978].

Con base en la discusión dada se puede concluir que la posición de las bandas B y Q de **1** concuerdan con lo expuesto por Gouterman, ya que la banda Soret aparece alrededor de 400 nm y las bandas Q son 10 veces más pequeñas que la Soret debido a que se presenta distorsión de campo ligante alrededor del metal y hace posible ver en el espectro la mezcla de transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ con las transiciones *d-d* del Fe(III) prohibidas por simetría, llamada regla de Laporte. Las transiciones *d-d* observadas tienen valores de ε aproximados a 50 $M^{-1}cm^{-1}$ y se espera que disminuya su intensidad en la medida en que el sitio se vuelva menos distorsionado. **1** y su precursor tienen simetría $\leq D_{4h}$; sin embargo, la disminución de la intensidad de las absorciones en **1** sugiere una disminución en la distorsión de la porfirina; lo que quiere decir, que el Fe(III) está más cerca del plano de la porfirina en **1** que en su precursor y por lo tanto se espera que muestre menos carácter de espín $s = 5/2$ que su precursor. **1** tiene ecm, $s = 3/2$, $s = 5/2$, y presenta menor carácter de espín $s = 5/2$ que su precursora; sin embargo, con base en la ΔQ calculada y comparada con lo reportado por Reyes Ortega y colaboradores, **1** presenta mayor carácter de espín $s = 5/2$ y se puede concluir que la posición del Fe(III) en el plano de la porfirina está levemente fuera del anillo de porfirina.

3.2 Espectroscopía de IR

El espectrofotómetro de infrarrojo más común comprende la región de longitud de onda de 400 a 4000 cm^{-1}. La espectroscopía de infrarrojo es una técnica basada en las vibraciones de los átomos de una molécula [Stuart, 2004]. Un espectro de infrarrojo es comúnmente obtenido pasando radiación infrarroja a través de una muestra y determinando qué fracción de la radiación incidente con una energía particular es absorbida. La energía con la cual cualquier pico en un espectro de absorción aparece corresponde a la frecuencia de vibración de una molécula o grupo químico presente en la muestra [Gouterman, 1973]. Para que una molécula muestre absorción en el infrarrojo el momento dipolar eléctrico de la molécula debe cambiar durante la vibración. Esta es la condición para obtener una banda de absorción para la espectroscopía de infrarrojo. Consecuentemente el estiramiento del enlace en una molécula homonuclear diatómica no da una banda de absorción en el infrarrojo según esta regla. La única regla de selección expone que las transiciones para las cuales $\Delta v = +1$ son permitidas

[Russell & Box, 1992]. Una molécula se puede considerar como un sistema de masas unidas por enlaces con propiedades tipo resorte. Tomando en consideración esto, las moléculas diatómicas tienen tres grados de libertad de traslación y dos grados de libertad rotacional. Los átomos en las moléculas también pueden moverse uno respecto del otro, es decir, las longitudes de enlace varían o un átomo puede moverse fuera de su plano presente. Esta es una descripción de los movimientos vibracionales de estiramiento y flexión que se conocen, **Figura 16**.

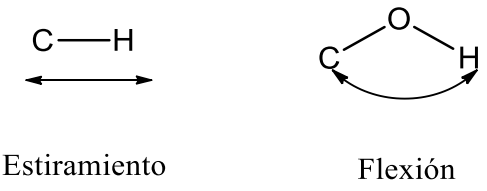


Figura 16. *Movimientos de estiramiento y flexión* [Pavia et al., 2001]

Para una molécula diatómica, solo es posible una vibración que corresponde al estiramiento y la compresión del enlace. Esto explica un grado de libertad vibracional. Los términos tijeras, balanceo, meneado, torsión, son usados para describir las bandas de infrarrojo, **Figura 17** [Pavia et al., 2001].

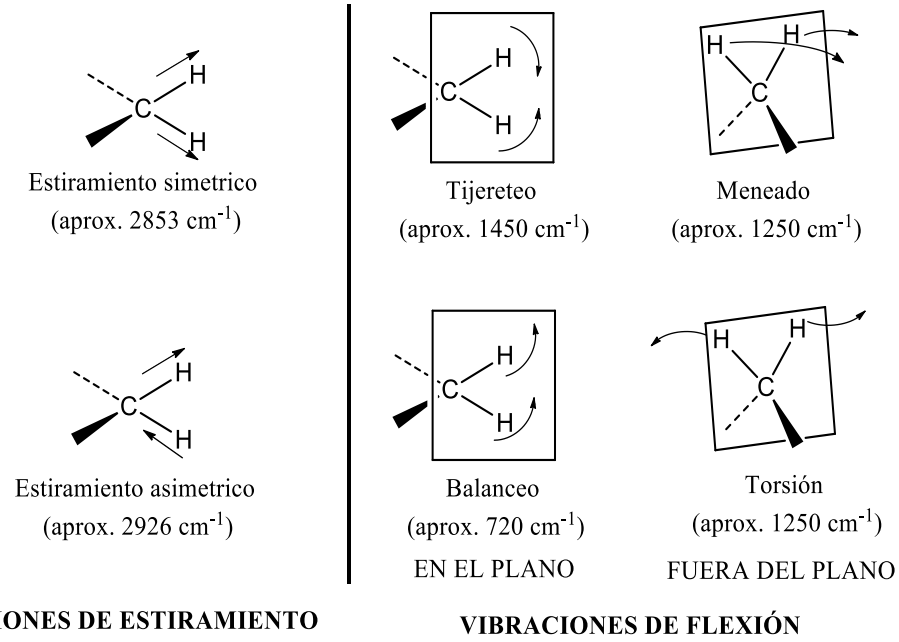


Figura 17. *Vibraciones de estiramiento y flexión y sus diferentes movimientos* [Pavia et al., 2001]

Las vibraciones de los enlaces se pueden describir mediante una analogía a un oscilador

armónico simple. Para dos átomos conectados por un enlace, la energía potencial, *V*, es dada por la **Ecuación 3**:

$$V = \frac{1}{2}\, kX^2 \qquad \textbf{Ecuación 3}$$

donde X es el desplazamiento de dos masas de su posición de equilibrio y *k* es la constante de fuerza para un sistema molecular que se mantiene unido por un enlace químico.

Sin embargo, el modelo clásico del resorte no es válido para una molécula porque el sistema molecular no puede ocupar un continuo de estados de energía vibracionales, puede ocupar solo niveles de energía discretos y cuantificados. Eso significa que el movimiento vibracional de un enlace en una molécula es anarmónico [Russell & Box, 1992].

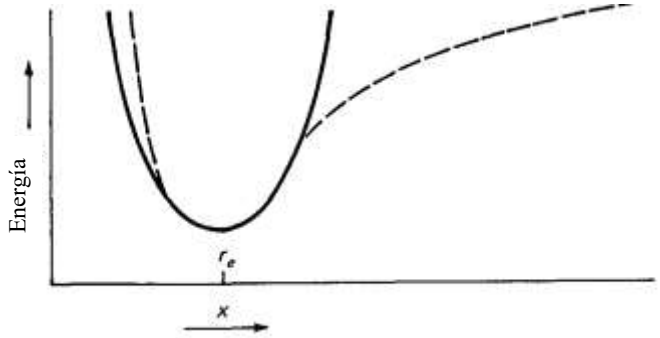


Figura 18. *Potencial de energía contra distancia, x, para a) un oscilador armónico (línea solida) y b) un oscilador anarmónico (línea punteada)*

La curva de energía potencial de una molécula real se comporta como la línea punteada, **Figura 18**, no es una parábola perfecta que corresponde al movimiento armónico simple.

La diferencia en energía, *ΔE*, entre los dos niveles adyacentes, E_υ y $E_{\upsilon+1}$, es dada por la **Ecuación 4**:

$$\Delta E = \left(\frac{h}{2\pi}\right)\left(\frac{k}{\mu}\right)^{1/2} \qquad \textbf{Ecuación 4}$$

donde *k* es la constante de fuerza y μ es la masa reducida [$\mu = m_A m_B/(m_A+m_B)$ para una molécula diatómica A-B], *h* es la constante de Planck [Russell & Box, 1992]. La espectroscopía de infrarrojo de porfirinas fue desarrollada desde 1950 [Alben, 1978].

Resultados. Se observa en la **Figura 19** que la banda vibracional de estiramiento N-H perteneciente al ligante tpe se observa en **1** sin mostrar cambio en la energía vibracional, es decir, esta banda no está afectada por la coordinación del ligante tpe al Fe(III). En los

espectros de **1** y su precursor se observa la banda de vibración *ν* C-N con la misma energía, adjudicándola a la vibración del anillo pirrólico [Alben, 1978]; así mismo, la banda de vibración C=O aparece en todos los espectros, sin embargo, se adjudica este enlace a la amida presente en el ligante tpe. También se observan las bandas de vibración del enlace C-H del cloroformo en ~771 cm^{-1} y las bandas de vibración del enlace O-H del metanol en ~3350-3435 cm^{-1}[Nakamoto, 2009].

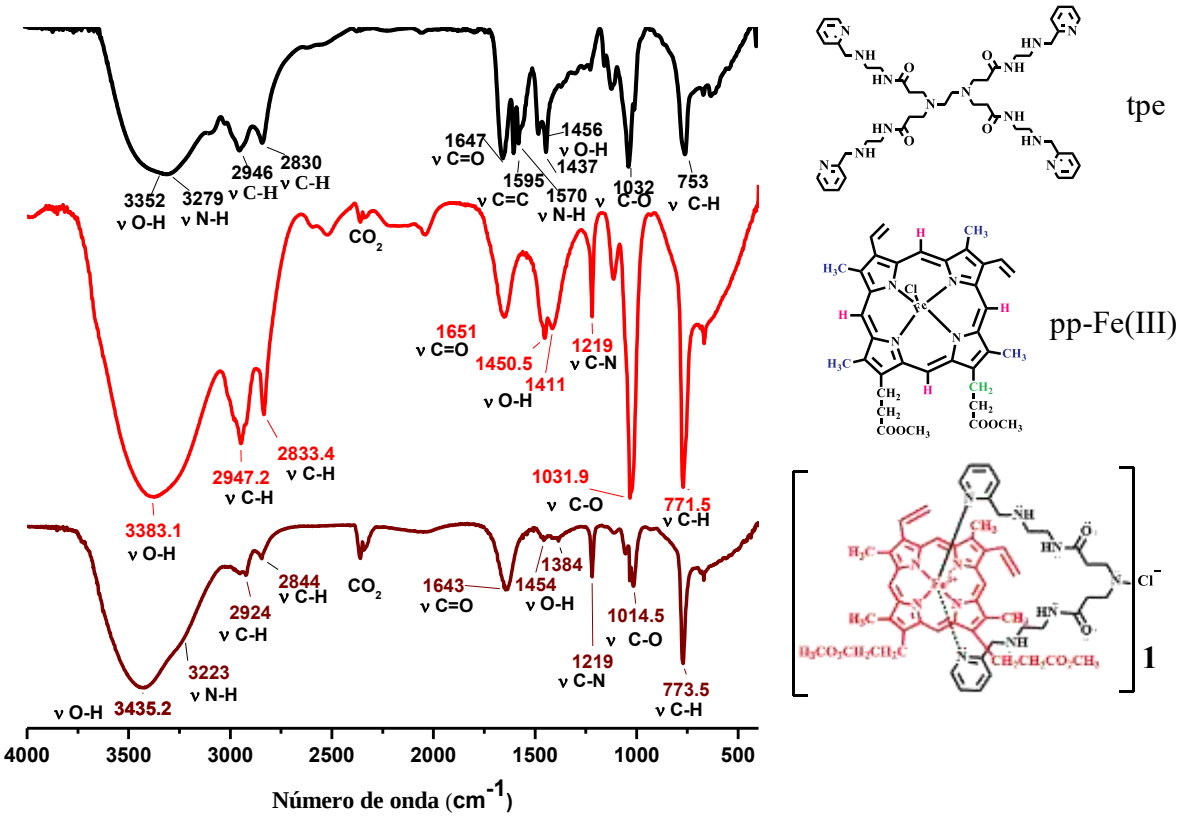


Figura 19. *Espectros comparativos de **IR** del tpe; pp-Fe(III) y **1** en $CH_3OH/CHCl_3$*

La información de estos espectros se resume en la **Tabla 6** donde se pueden observar las vibraciones más importantes de estos compuestos.

Tabla 6. *Principales absorciones de IR de tpe, pp-Fe(III) y **1** en $CHCl_3$*

Enlace	*v* N-H (cm^{-1})	*v* C-H (cm^{-1})	*v* C-N(cm^{-1})
tpe	3279	2946	
pp-Fe(III)		2947	1219
[(tpe)(pp)]Fe(III) **(1)**	3223^{l}	2924^{l}	1219^{p}

**l es la señal de vibración perteneciente al ligante*
p es la señal de vibración perteneciente a la porfirina

Se realizaron los cálculos de la constante de fuerza para los enlaces más importantes del ligante tpe, **1** y su precursor, como se muestra en la **Tabla 7**, en donde se observa que se necesita más energía para hacer vibrar el enlace N-H en **1** que en el ligante tpe. En el enlace C=O de **1** la constante de fuerza prácticamente no cambia con respecto al ligante tpe, pero sí cambia con respecto a su precursora, informando que se ve afectada esta banda de vibración perteneciente al anillo aromático de la porfirina por la coordinación del Fe(III) con el ligante tpe, haciendo que se necesite más energía para realizar una transición vibracional.

Tabla 7. *Constante de fuerza de los principales enlaces de tpe, pp-Fe(III) y **1***

***k* (dina cm^{-1}) x 10^5**			
Enlace	**tpe**	**pp-Fe(III)**	**1**
N-H	6.4	-----	6.5
C-H	4.7	4.4	4.6
C=O	9.6	8.6	9.5

Discusión. Las bandas de absorción de las porfirinas han sido empíricamente asignadas por comparación con un gran número de porfirinas y complejos metálicos porfirínicos cuya estructura química es bien definida por síntesis, análisis elemental y una variedad de métodos espectroscópicos. En los primeros trabajos de Mason (1958), las absorciones debidas a los modos de flexión NH en el plano y fuera del plano se determinaron por comparación con derivados deuterados y con los modos vibracionales del pirrol [S. F. Mason, 1958]. Las porfirinas sin metal tienen una simetría reducida debido a los grupos NH de pirrol, mientras que los complejos de metal(II) se aproximan a la simetría D_{4h}. Cabe señalar que las vibraciones E_u están todas en el plano y los modos A_{2u} están fuera de los modos activos del infrarrojo [Alben, 1978]. Las porfirinas exhiben la polarizabilidad de los sistemas aromáticos altamente conjugados, de modo que una perturbación en una porción de la molécula produce

efectos que se observan en toda su estructura. Estos efectos se han demostrado de varias maneras e incluyen cambios en la simetría de la estructura de la porfirina, efectos de campo del ligante al metal coordinado, efectos electrónicos y magnéticos transmitidos a través del metal hacia o desde la porfirina e interacciones no covalentes con moléculas circundantes. La acomplejación de un ion metálico con una porfirina causa que varias bandas de absorción cambien a una frecuencia mayor o menor [Alben, 1978]. También magnéticamente la inclusión de un ion metálico en el centro del macrociclo cambia la respuesta del material resultante ante un campo magnético [Walker, 1979].

Con base en la discusión dada se puede concluir que el ligante tpe se coordina a la pp-Fe(III) ya que se observa en el espectro de IR del compuesto **1** la señal de la banda característica del enlace N-H del ligante tpe. La coordinación de la porfirina con el ligante tpe afecta las bandas de vibración del ligante tpe haciendo que necesiten mayor o menor energía para hacer vibrar los enlaces [Alben, 1978].

3.3 Espectroscopía de RMN-^{1}H

La RMN es una espectroscopía de absorción en la que la muestra absorbe radiación magnética en la región de radiofrecuencias (3 MHz a 30,000 MHz). La espectroscopía magnética nuclear es el estudio de una estructura molecular y magnética a través de la interacción de un campo magnético oscilante de radiofrecuencias con una colección de núcleos inmersos en un campo magnético externo fuerte [Macomber, 1998].

La componente cuantificable más importante del espín nuclear es expresada en términos del número cuántico magnético de espín I, donde I =1/2, 1, 3/2 etc. La unidad de I es $h/2\pi$, donde h es la constante de Planck. Los núcleos que tienen $I \neq 0$ también poseen un momento magnético $\vec{\mu}$ descrito por la **Ecuación 5**:

$$\vec{\mu} = \gamma\vec{I}(\mathrm{h}/2\pi) \qquad \textbf{Ecuación 5}$$

donde la constante γ es llamada la razón giromagnética y tiene un valor característico para cada núcleo en particular [Janson & Katz, 2003]. Esta espectroscopía se basa en las transiciones magnéticas nucleares entre los niveles magnéticos del Zeeman nuclear en las moléculas. Se pueden estudiar muchos núcleos que tienen $I_N \neq 0$, pero los núcleos más comunes son los de ^{13}C e ^{1}H porque tienen mayor contribución a sus isótopos y su abundancia

natural es generosa [Pavia et al., 2001].

Existía la creencia de que no se podía detectar el espectro RMN de un complejo paramagnético porque el momento del giro del electrón era tan grande que causaría una relajación nuclear rápida que conduciría a un corto tiempo T_1 para el decaimiento del núcleo estudiado dando lugar a un ensanchamiento de la señal. Este es el caso de ciertos iones metálicos como el Mn(II), pero no es el caso para muchos otros. Los electrones desapareados tienen momentos magnéticos cuya intensidad es dada por la **Ecuación 6**:

$$\mu = g_e \left[S(S+1)^{\frac{1}{2}} \right] \mu_B \qquad \textbf{Ecuación 6}$$

donde g_e es el factor para el electrón libre, S es el espín total, y μ_B es el magnetón de Bohr que es igual a 9.27×10^{-24} J*T^{-1} [Russell & Box, 1992]. El electrón desapareado en un orbital molecular también puede polarizar el espín de un par de electrones en un orbital molecular doblemente ocupado; a esto se le llama interacción magnética por polarización de espín. Un núcleo en una molécula que contiene uno o más electrones desapareados en orbitales atómicos *s*, puede experimentar densidad del espín electrónico en su punto en el espacio y / o sentir la densidad del espín que está cerca de él. Finalmente, una gran parte de los electrones desapareados en una molécula están siempre localizados en los orbitales atómicos metálicos paramagnéticos [Russell & Box, 1992].

El núcleo magnético en una molécula paramagnética interactúa con los electrones desapareados justo como un dipolo magnético interactúa con otro dipolo magnético [Russell & Box 1992]. De acuerdo al principio de incertidumbre de Heisenberg, **Ecuación 7**:

$$\Delta v \propto \frac{1}{2\pi \Delta t} \qquad \textbf{Ecuación 7}$$

donde Δt es el tiempo de vida, Δv es la frecuencia y π es constante [Russell & Box, 1992].

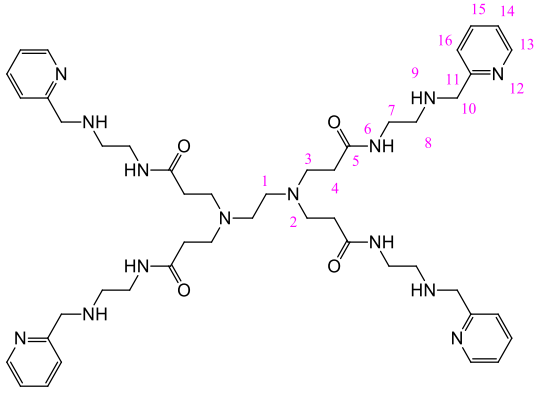


Figura 20. *Estructura del ligante tpe* [Cervantes-Mejía et al., 2014]

En el espectro de ^{1}H-RMN del ligante tpe, **Figura 20**, se muestran los desplazamientos químicos en 8.50 ppm para H-16, en 8.60 ppm para H-6 y 14, en 7.25 ppm para H- 13, en 7.16 ppm para H-15, en 3.80 ppm para H-10, en 3.34 para H-7, en 2.77 para H-3, en 2.71 para H-8, en 2.62 para H-14 y en 2.29 para H-9; como lo reportado por Cervantes-Mejía, *et al.*, 2014.

Resultados. Para el pp-Fe(III) las señales de los cuatro grupos metilo-hemo son localizables rápidamente por su mayor intensidad y su posición en frecuencias altas (> 74 ppm) en porfirinas- Fe(III) de alto espín $s = 5/2$ [Reyes-Ortega et al., 1998], en la **Figura 21 a**, se muestra el espectro de la porfirina precursora observándose un espectro bien definido. Para ecm ($s = 3/2$, $s = 5/2$) se requiere una frecuencia < 74 ppm, para un alto espín ($s = 5/2$) corresponde una frecuencia > 74 ppm y para espín bajo ($s = 1/2$) < 30 ppm. En el espectro de **1**, **Figura 21 b**, que tiene una simetría $\leq D_{4h}$, se observan las señales de los cuatro grupos metilo-hemo en una menor frecuencia que su precursor; debido a la coordinación con ligante tpe.

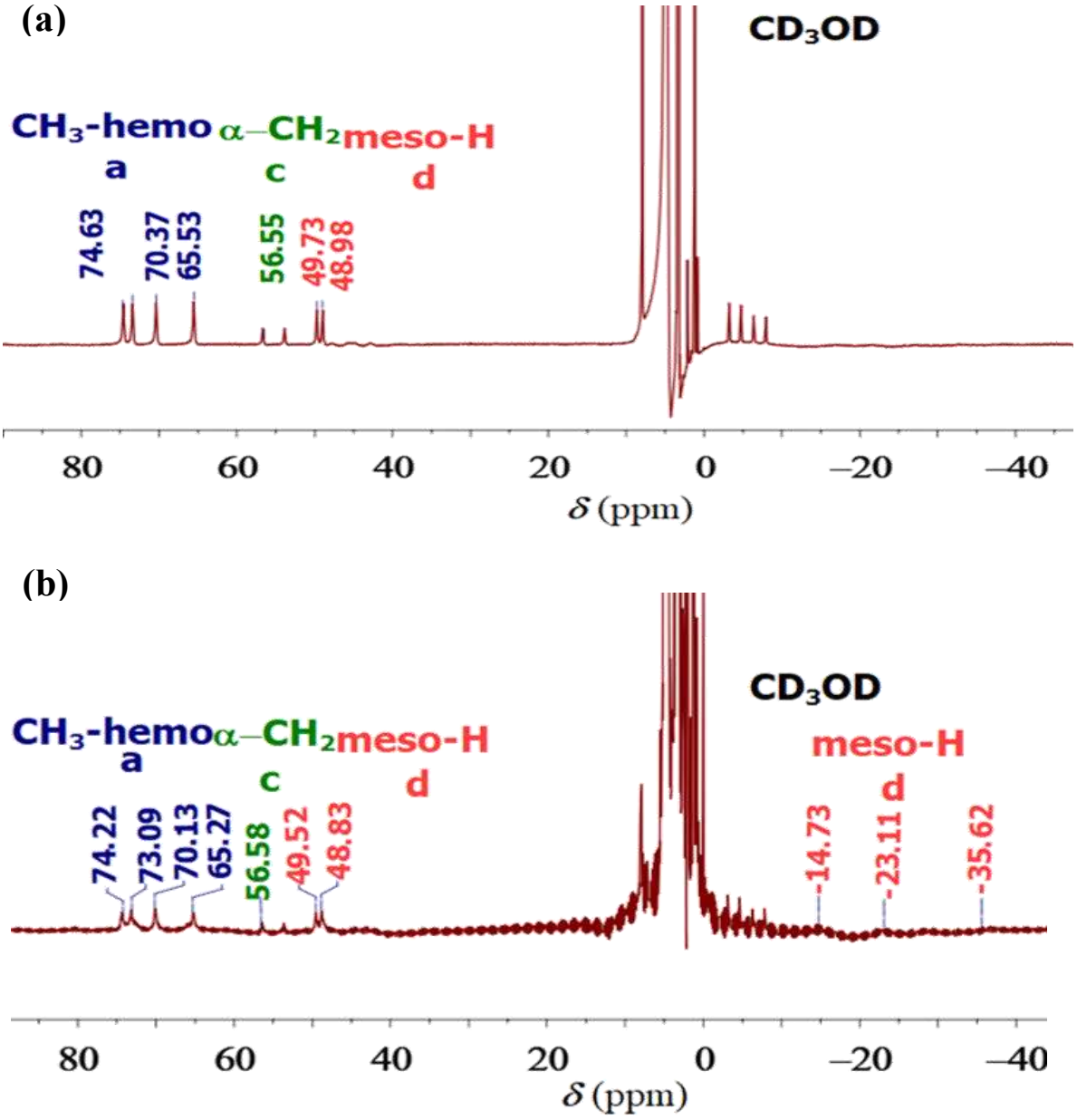


Figura 21. *Espectros de **RMN-^{1}H** de **pp-Fe(III)** y **1**. a) pp-Fe(III) y b) **1**. El disolvente utilizado fue CD_3OD, temperatura 25°C. Referencia TMS*

En la **Tabla 8** aparece el factor de Q_{asim} = (Apertura de las señales de los $\delta_{CH_3\text{-hemo}}$)/(promedio $\delta_{CH_3\text{-hemo}}$) para **1** y su precursor. El factor Q_{asim} informa acerca de la anisotropía magnética que se presenta en el plano de la porfirina [Reyes-Ortega, 1998; Budd et al., 1979]; también se pueden observar los datos de los espectros de RMN-^{1}H para **1** y su precursor.

Tabla 8. *RMN-* ^{1}*H de pp-Fe(III) y* ***1***

Complejo	CH_3-hemo (ppm)	Apertura CH_3-hemo (ppm)	Promedio CH_3-hemo (ppm)	Q_{asim}	meso-H (ppm)	α-CH_2 (ppm)
pp-Fe(III)	74.6, 72.5, 70.4, 65.5	9.1	70.8	0.128	49.7-48.9	56.5
1	74.2, 73.1, 70.1, 65.3	8.9	70.7	0.126	49.5, 48.8, -14.7, -23.1, -35.6	56.6

Discusión. El primer espectro de resonancia de porfirinas fue publicado por Becker y Bradley en 1959 [Janson & Katz, 2003]. Básicamente, hay tres parámetros que se pueden obtener a partir de un espectro de RMN. Estos son (1) la frecuencia de la absorción de energía (desplazamiento químico), (2) la división de la señal de absorción resultante por las interacciones espín-espín, y (3) la intensidad relativa de la señal de absorción, que es una medida del número de núcleos que se estudian. En el espectro RMN de las porfirinas, el desplazamiento químico es el parámetro más importante, ya que informa de la anisotropía magnética que se presenta en el plano de la porfirina [Budd et al., 1979].

Los núcleos de mayor interés en la química de porfirinas (^{1}H, ^{13}C y ^{15}N) tienen I = 1/2, y para estos habrá dos niveles de energía permitidos, **Figura 22**. Las energías de estos dos niveles están dadas por la **Ecuación 8**:

$$E = \pm \mu H_0 \qquad \textbf{Ecuación 8}$$

La separación de energía entre estos dos estados está descrita por la **Ecuación 9**:

$$\Delta E = 2\mu H_0 \qquad \textbf{Ecuación 9}$$

donde H_0 es el campo magnético y μ es la masa reducida. A temperatura ambiente la población relativa de los dos niveles de energía es dado por una distribución de Boltzman, y debe ser tal, que haya un ligero exceso del número de núcleos en el estado de energía más baja [Janson & Katz, 2003] .

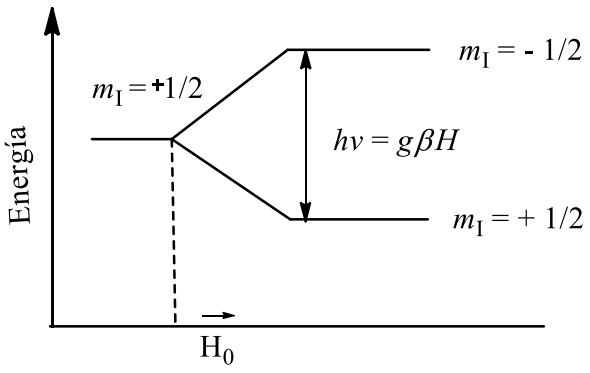


Figura 22. *Los dos niveles de energía permitidos para un núcleo con I = ½ en un campo magnético externo H_0* [Pavia et al., 2001]

La regla de selección para la espectrometría de resonancia magnética nuclear es la siguiente: $\Delta m_I = \pm 1$ y $\Delta m_S = 0$ [Russell & Box, 1992].

Con base en lo anterior se puede concluir que cuando se enlaza el ligante tpe axialmente a el pp-Fe(III), las señales de los hidrógenos meso se aprecian en frecuencias bajas y negativas (~ -35ppm) esto debido a que el ligante axial cede densidad electrónica al Fe(III) y los protones meso quedan altamente protegidos por la densidad electrónica, característica de estados de espín del Fe(III) ecm, pero con predominante espín medio $s = 3/2$. De acuerdo con la literatura química para el ecm ($s = 3/2$, $s = 5/2$) se deben observar desplazamientos químicos de los grupos metilo-hemo ≤ 74 ppm y se observan para **1**, concluyendo que sí tiene ecm. Las señales de los grupos metilo-hemo aparecen en frecuencias ligeramente más bajas que para el alto espín [Reyes-Ortega, 1998].

En el espectro de **1** y su precursor se observa que el tiempo de relajación del espín nuclear es corto y por lo tanto las señales se ven anchas.

Los anchos de banda en **1** son de 150 a 1250 Hz y para su precursor son de 75 a 110 Hz, y tienen un tiempo de relajación T_2 de 5.71×10^{-3} s a 8×10^{-4} s para **1** y para su precursor de 0.013 s a 9.09×10^{-3} s, lo que quiere decir que las bandas para **1** son efectivamente más anchas en comparación con las de su precursor.

Para **1** se observan señales que son características de una mezcla cuántica de estados de espín con δ = 49.52, 48.83, -14.73, -23.11, -35.62 ppm (H-meso). Con base en el factor Q_{asim} se concluye que la coordinación axial del tpe a la pp-Fe(III) no es simétrica, a pesar de que **1** se vuelve más simétrica que su precursor. El valor de Q_{asim} es el mismo para la pp-Fe(III) y **1**. Estos valores concuerdan con los presentados por Budd *et al.*, 1979 (Budd et al., 1979). Lo

que significa que cuando el ligante axial se coordina a la protoporfirina-Fe(III) no afecta la simetría magnética del compuesto.

3.4 Espectroscopía de RPE

El intervalo de frecuencia utilizado en RPE es 10^9-10^{12} s^{-1} (1-1000 GHz). Esta espectroscopía toma ventajas de la interacción entre la componente magnética de la radiación electromagnética y los momentos magnéticos que surgen de los electrones desapareados [Weil, 2007]. El estado de energía más bajo en el Zeeman electrónico en RPE corresponde a m_s = -1/2 por convención, **Figura 23**.

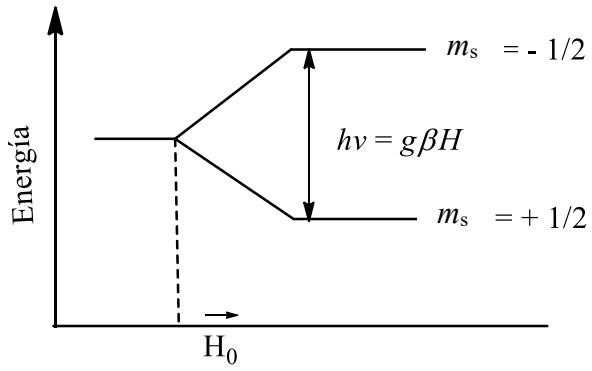


Figura 23. *Desdoblamiento energético en RPE* [Pavia et al., 2001]

El hamiltoniano Zeeman para la interacción de un electrón con campo magnético es dada por la **Ecuación 10**:

$$\hat{H} = g\beta\vec{H}\cdot\hat{S} \qquad \textbf{Ecuación 10}$$

donde g tiene un valor de 2.002, β = magnetón Bohr, $\hat{S}$ es el operador de espín y $\vec{H}$ es la fuerza del campo aplicado.

En RPE, los espectros nos informan que un valor de $g \sim 2$ es indicativo de que la muestra que se estudia contiene a un electrón desapareado. La relación de la frecuencia absorbida por el electrón para cambiar su giro ($h\upsilon$) relativo al campo aplicado que mantiene al espín electrónico en la dirección del campo nos da la condición para que se lleve a cabo una transición de RPE, **Ecuación 11**:

$$g = \frac{hv}{g_e \beta H}$$ **Ecuación 11**

En sistemas con bajo espín Fe(III) la RPE es capaz de examinar el desdoblamiento de energía de los orbitales d_{xy}, d_{xz}, y d_{yz} y nos puede dar información acerca de la donación π de los centros hemo comparada con la de los ligantes orgánicos. La interpretación de los valores de g no es fácil en términos de energía debido a los efectos de la covalencia y el acoplamiento espín – órbita.

Los espectros RPE de complejos de ion metálico de transición contienen una gran cantidad de información sobre sus estructuras electrónicas. La información adicional y las complicaciones asociadas que son características de los sistemas de ión metálico de transición surgen debido a la degeneración aproximada de los orbitales *d* y porque muchas de las moléculas contienen más de un electrón desapareado. Estas propiedades dan lugar a contribuciones orbitales y efectos de campo cero. Los valores de g para muchos complejos metálicos son anisotrópicos. El acoplamiento espín-órbita también da lugar a grandes desdoblamientos a campo cero por mezcla de los estados basal y excitado. La regla de Kramers establece que, cualquier ion con un número impar de electrones debe tener siempre como su nivel más bajo al menos un doblete en ausencia de campo magnético, llamado doblete de Kramers [Russell & Box, 1992].

Con respecto a los intermediarios catalíticos de las peroxidasas o modelos de éstas, la velocidad de la reacción de las peroxidasas hace difícil visualizar los compuestos intermediarios (Compuesto I y II); sin embargo, espectroscopías finas como RPE han sido aplicadas por la sensibilidad con la cual nos permite describir la naturaleza del enlace en los complejos y detectar el acoplamiento entre especies [Hernández-Anzaldo et al., 2016].

Resultados. El espectro de RPE de la porfirina precursora, **Figura 24** , en banda X a T = 90 K, muestra varias señales características de diferentes especies de Fe(III) [Reyes-Ortega 1998]. La especie A axial g_{II}^{A} = 2.05 y $g_{\perp}^{A}$= 5.2, la segunda especie B axial g_{II}^{B}= 2.2 y $g_{\perp}^{B}$= 4.2. Para **1** se muestra la misma forma de línea del espectro que la de su precursor con un cambio en los valores de g: la especie A axial g_{II}^{A}= 1.9 y $g_{\perp}^{A}$= 5.6, la segunda especie B axial g_{II}^{B}= 2.1 y $g_{\perp}^{B}$= 4.3. Dichos valores corresponden a ecm: para la especie A con $s = 5/2 > s = 3/2$, para la especie B corresponde $s = 3/2 > s = 5/2$. El espectro que se observa para **1** y su

precursor es un espectro axial con pequeña rombicidad que de acuerdo a la literatura correspondiente a una simetría < D_{4h} [Mabbs, 1993]. Los valores de $g_{\perp}$ y g_{II} para el Fe (III) son diferentes de los que se esperan para estados de espín puro $s = 5/2$ y $s = 1/2$.

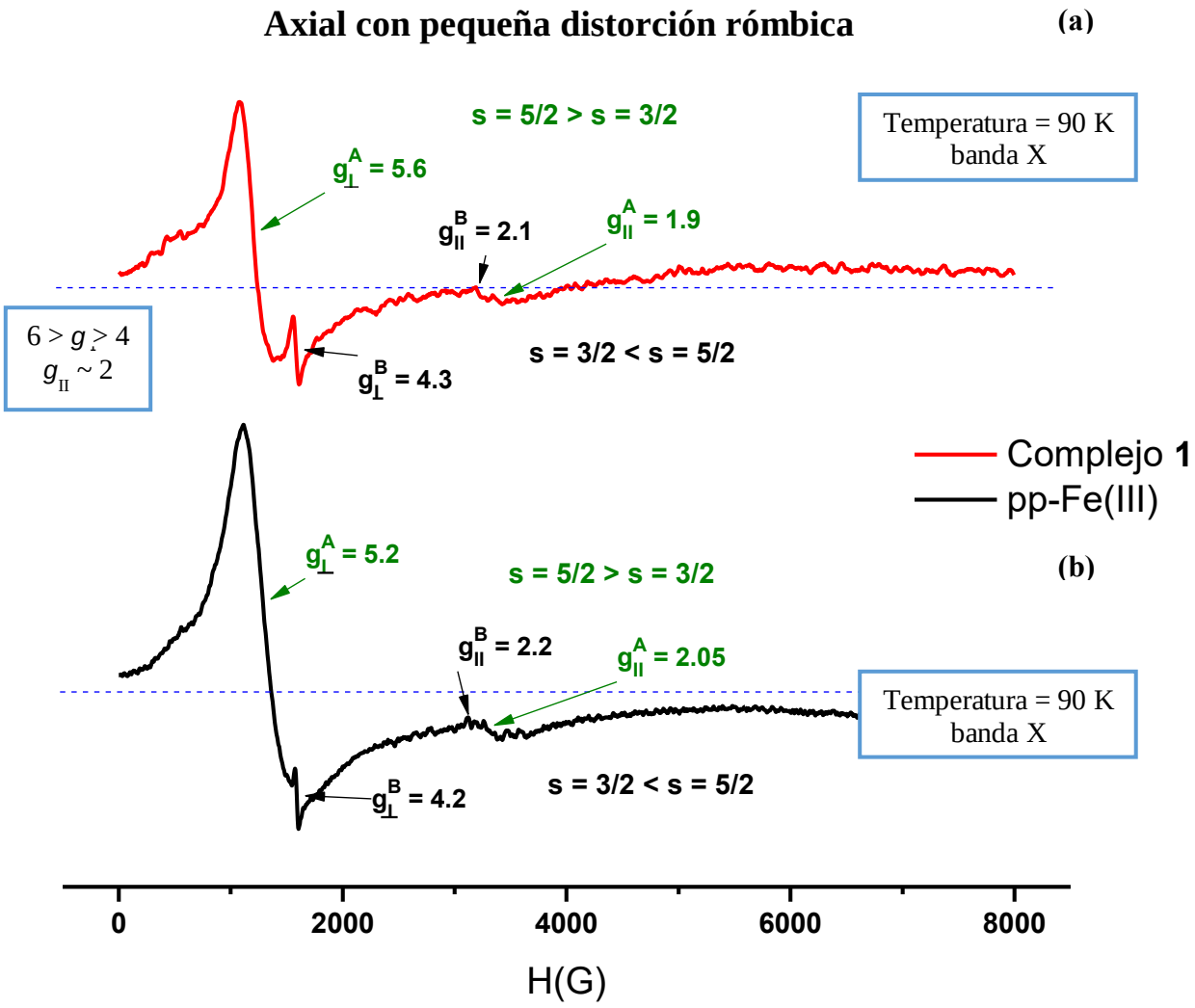


Figura 24. *Espectro RPE de* ***a) 1*** *y* ***b) pp-Fe(III)*** *en banda X a una temperatura de 90K*

La anchura de los espectros de RPE se debe a la relajación espín –red que resulta de la interacción de iones paramagnéticos con las vibraciones térmicas de la red. Para algunos compuestos el tiempo de vida de la relajación espín-red es bastante largo y se puede observar el espectro a temperatura ambiente, mientras que en otros compuestos no es posible. Lo anterior informa que el tiempo de relajación espín-red incrementa conforme la temperatura

decrece. Muchos de los compuestos metálicos necesitan ser enfriados a temperatura de N_2 líquido o He líquido para que se observen espectros mejor resueltos, porque las especies excitadas bajan a su estado de menor energía y la absorción es observada más veces creciendo la señal.

La **Ecuación 12** es un hamiltoniano que describe a los espectros de RPE. Como se observa en la **Figura 25**, los espectros presentan desdoblamiento de campo cero. El tensor asimétrico llamado tensor de desdoblamiento a campo cero, **D** axial (en el eje z), es el que diagonaliza en el eje Z, y **E** rómbico (en el plano x y) es un tensor ocupado para diagonalizar en los ejes Y y X [Russell & Box, 1992].

$$\hat{H} = g\beta\vec{H}\cdot\hat{S} + \underbrace{D(\hat{S}_z^2 - \frac{1}{3}\hat{S}.\hat{S}) + E(\hat{S}_x^2 - \hat{S}_y^2)}_{\text{Desdoblamiento de campo cero axial y rómbico}} \qquad \textbf{Ecuación 12}$$

Discusión. Desde los trabajos de Pauling y Coryell en 1936 se consideraron el estado de espín medio y las propiedades magnéticas de las hemoporfirinas tales como hemoglobina, oxihemoglobina, ferrihemoglobina, ferrihemoglobina fluoruro, ferrihemoglobina cianuro etc., donde se observó que la ferrihemoglobina presenta un momento de 4.47 magnetones de Bohr [Linus, 1936; Coryell et al., 1937]; valor que fue el origen de la asociación del estado de espín $s = 3/2$; sin embargo, el argumento teórico de Griffith en 1956 para espín medio en una simetría octaédrica debilitó el argumento del estado de espín $s = 3/2$, pudiéndose explicar más datos magnéticos hemo-intermedios como mezclas térmicas (las moléculas pueden ser monitoreadas en dos estados de espín puro magnéticamente distinguibles) de estados de espín puro $s = 1/2$ y $s = 5/2$ sin consideración del estado 3/2 o ecm (que corresponde a una sola especie magnética con propiedades magnéticas distintas de sus especies puras) [Iizuka T. & Kotani, 1969; Yonetani et al., 1972]. Sin embargo, los citocromos fueron una excepción ya que dieron valores intermedios de momento magnético con los datos de intervalo de temperatura disponibles que no se ajustan a los patrones de una mezcla térmica [Tasaki et al., 1967; Maltempo & Moss, 2009].

La mezcla mecánica-cuántica de estados de espín en una hemoproteína se refiere a la función de onda que representa la contribución de dos o más diferentes estados de espín hierro-hemo [Maltempo, 1974]. La mezcla cuántica de estados de espín deberá ocurrir si hay un operador de energía diferente de cero. El mecanismo más frecuente para la mezcla de

estados de espín en complejos hemo es la interacción espín-órbita [Sánchez-Sandoval et al., 2003]. Las reglas de selección para la interacción espín-órbita entre diferentes estados de espín hierro-hemo son, **Ecuación 13**, [Griffith, 1956]:

i) $\Delta S = 0, \pm 1$ y ii) $\Delta S_z = 0, \pm 1$ **Ecuación 13**

Para complejos hemo-férricos la primera regla de selección indica que mientras $s = 3/2$ puede mezclarse con los estados de espín alto $s = 5/2$ y bajo $s = 1/2$, estos últimos no pueden mezclarse entre sí. Sin embargo, aunque la mezcla de estados de espín sea permitida por reglas de selección, la mezcla solo ocurrirá si la separación de energía entre los estados de espín puro no perturbados es comparable o menor que la constante de acoplamiento espín-órbita.

Por razones experimentales y teóricas se cree que el cuarteto, $^4A_2$, involucrado en la mezcla de estado de espín en los ferricitocromos *c´* es el mismo que se acopla débilmente al estado sexteto, $^6A_1$, basal en las proteínas hemo de espín alto, lo que resulta en los conocidos desdoblamientos de campo cero 2D y 4D de los tres dobletes de Kramers del estado fundamental. En la **Figura 25** se muestran los niveles de energía para los estados electrónicos en la presencia de un campo cristalino y luego sobre la adición de la interacción espín-órbita; la **Figura 25 (A)** predice la situación de una hemoproteína de alto espín; por ejemplo, met-mioglobina, donde en ausencia del acoplamiento espín-órbita el estado no perturbado $^6A_1$ está cerca de 2000 cm^{-1} debajo del estado no perturbado $^4A_2$. La **Figura 25 (B)** muestra la correspondiente configuración del estado no perturbado $^4A_2$ que está cerca de 2000 cm^{-1} debajo del estado $^6A_1$. La **Figura 25 (C)** predice la situación en las configuraciones del espín mezclado cuánticamente, $\Delta \approx \lambda$ (λ normalmente está en el orden de unos pocos miles de cm^{-1}), donde Δ= desdoblamiento de campo cristalino, λ= constante de interacción espín –órbita $= \lambda \vec{S} \cdot \vec{L}$.

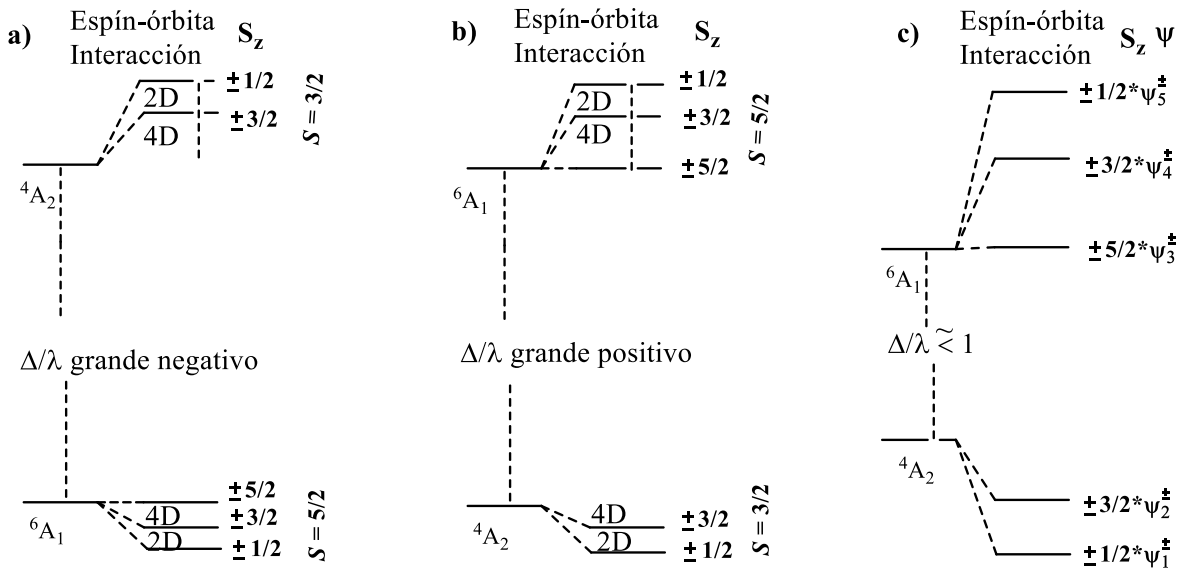


Figura 25. *Niveles de energía de los estados electrónicos hierro-porfirina en presencia de campo cristalino tetragonal y acoplamiento espín-órbita para: a) Δ/λ grande y negativa; b) Δ/λ grande y positiva; y c) Δ/λ ≤ 1, mezcla cuántica de estados de espín del Fe(III)* [Maltempo & Moss, 2009]

En la **Figura 26** se pueden observar las gráficas de Maltempo y Moss y muestra en **Figura 26 a)** las cantidades relativas de mezclas de alto espín ($|^6A_1 \pm 1/2>$) y espín intermedio ($|^4A_2 \pm 1/2>$) al estado basal del doblete de Kramers $\psi_1^{\pm}$, graficado como una función de Δ/λ. Cuando Δ es cero $\psi_1^{\pm}$ es una mezcla igual de dobletes de espín alto e intermedio. Para valores grandes de Δ/λ la composición de $\psi_1^{\pm}$ se enfoca a un doblete espín puro intermedio o un espín alto puro dependiendo del signo de Δ. Para un valor dado de Δ/λ el doblete $\psi_2^{\pm}$ tiene mezclas comparables de componentes de espín alto, $s = 5/2$, y espín intermedio, $s = 3/2$, como el estado doblete basal $\psi_1^{\pm}$. Sin embargo, $\psi_2^{\pm}$ es siempre un poco más cercana a un doblete de espín puro debido a los elementos de la matriz espín-orbita más pequeños entre sus componentes mezclados fuera de la diagonal. Las mezclas de estados de espín a los dobletes $\psi_5^{\pm}$ y $\psi_4^{\pm}$ son simplemente los componentes a las mezclas de estados de espín de los dobletes $\psi_1^{\pm}$ y $\psi_2^{\pm}$. Esto es si el doblete $\psi_1^{\pm}$ es compuesto de 80% $|^4A_2 \pm 1/2>$ y 20% $|^6A_1 \pm 1/2>$, entonces $\psi_5^{\pm}$ debe ser compuesto de 20% $|^4A_2 \pm 1/2>$ y 80% $|^6A_1 \pm 1/2>$. La **Figura 26 b)** muestra el gráfico de $g_\perp$ como función de Δ/λ para el $\phi_1^{\pm}$ doblete de Kramers [Maltempo, 1974].

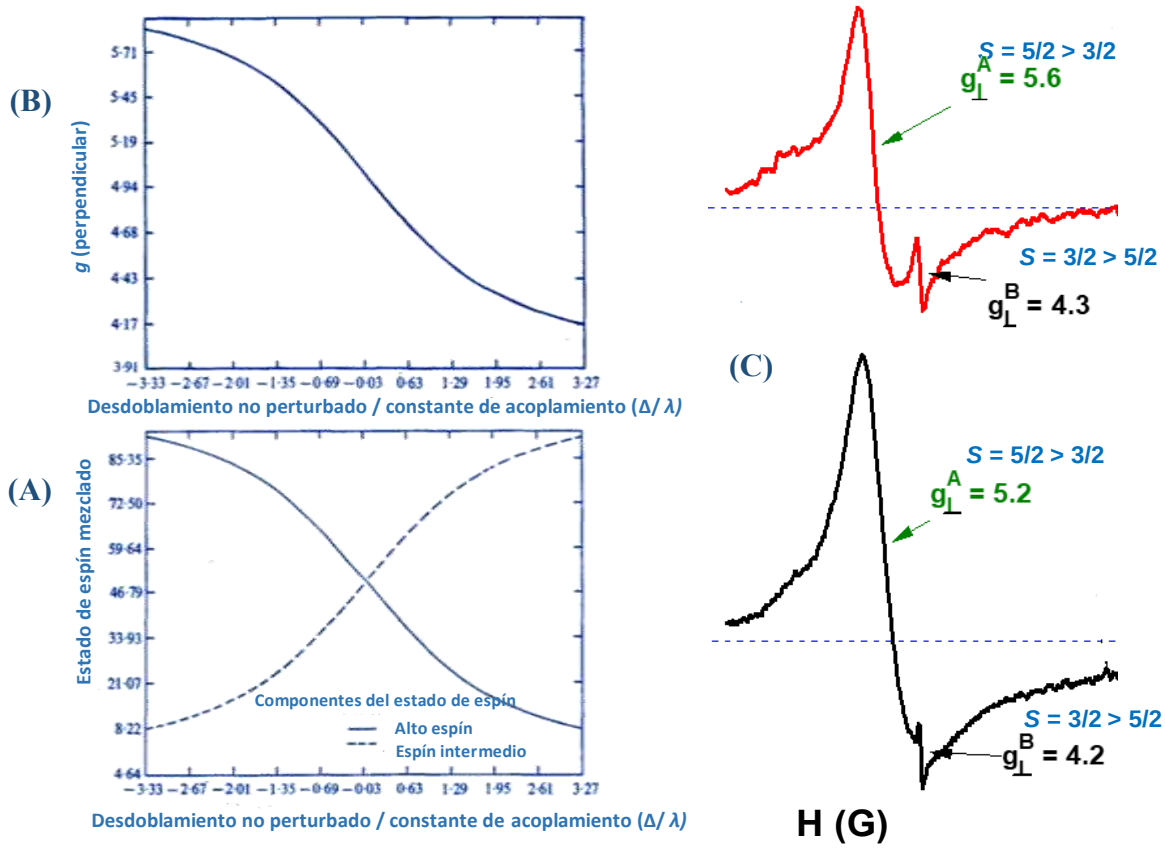


Figura 26. *Gráficas de Maltempo y Moss a) y b)* [Maltempo & Moss, 2009]*, y c) es el porcentaje de espín s = 5/2, s = 3/2*

Resultados. Los análisis con los diagramas de Maltempo y Moss, nos permiten determinar el porcentaje de las poblaciones de espín, en donde se observa, **Figura 26 c),** que para **1** hay un porcentaje de 74% de ecm A (espín $s = 5/2 > s = 3/2$) y un porcentaje de 26% de ecm B (espín $s = 3/2 > s = 5/2$). Para su precursor, **pp-Fe(III)**, se observa un porcentaje del 83% de ecm A (espín $s = 5/2 > s = 3/2$) y un porcentaje del 26% de ecm B ($s = 3/2 > s = 5/2$). En la **Tabla 9** se resumen los resultados obtenidos de los porcentajes de poblaciones de espín de **1** y su precursor.

Esto nos indica que cuando el ligante tpe se coordina a la pp-Fe(III) hay una contribución de espín $s = 3/2$ sobre el espín $s = 5/2$ en las especies con mce y se espera una mayor actividad catalítica para **1** con respecto a su precursor.

Tabla 9. *Porcentajes de mezcla cuántica de espín, s = 3/2, s = 5/2 en **1** y su precursor*

Porfirina	ecm A	ecm B
	***s* = 5/2, 3/2**	***s* = 3/2, 5/2**
1	**74%**	**26%**
	[69.54%(*s*=5/2),30.46%(*s*=3/2)]	[11.10%(*s*=5/2), 88.90%(*s*=3/2)]
Precursor	**83%**	**17%**
	[60.62%(*s*=5/2), 39.38%(*s*=3/2)]	[10.17%(*s*=5/2), 89.83%(*s*=3/2)]

Con base en la discusión se puede concluir que la pp-Fe(III) tiene señales en frecuencias ~74 ppm, valor reportado para porfirinas-Fe(III) con ecm *s* = 3/2, 5/2. Para **1** las señales de los grupos metilo-hemo se encuentran en 74.22 ppm, indicado que el Fe(III) presenta el fenómeno magnético conocido como ecm *s* = 3/2, 5/2. Se observa en la **Tabla 9** para **1** que el porcentaje de ecm de la especie A es de 74% del cual 69.5% pertenece a *s* = 5/2 y 30.46% a *s* = 3/2; y para su precursor el porcentaje de ecm de la especie A es de 83% del cual 60.62% corresponde a *s* = 5/2 y 39.38% es de *s* = 3/2. La especie B de **1** tiene un porcentaje de 26% siendo el 11.10% de *s* = 5/2 y 88.90% de *s* = 3/2; y para su precursor la especie B tiene un porcentaje de 17% del cual 10.17% pertenece a *s* = 5/2 y 89.83% a *s* = 3/2. Debido a que para **1** el porcentaje de *s* = 3/2 > *s* = 5/2 en la especie B, y mayor que para el precursor, se espera una mayor actividad catalítica para **1** que para su precursor.

3.4.1 Espectroscopía de RPE de la reacción de **1** con H_2O_2

Resultados. En el espectro de la **Figura 27** se observa que la señal de $g_{\perp}$ con mayor porcentaje de *s* = 5/2 en la mce, se desplazan hacia valores ~ 6 y la señal de $g \sim 4$ se intensifica notablemente en la **Figura 27 b)** en compración con el espectro presentado en **1**, **Figura 27 a)**. Aparece una señal axial alrededor de 6 que corresponde a una especie de alto espín, pero esta señal no es muy intensa. La señal alrededor de $g = 4$ va acompañada de una pequeña señal alrededor de 2. Se observa una señal con $g = 1.9$ que es característica de radical libre, **Figura 27 c)**. La señal en $g = 4$ es típica de ferrilo **Fe(IV)** que va acompañada de una señal con $g < 2$ característica de radical libre desplazada a campos más bajos por la deslocalización

del radical en la estructura conjugada. Se observa que el H_2O_2 reacciona con **1** para dar productos de reacción diferentes a la materia prima.

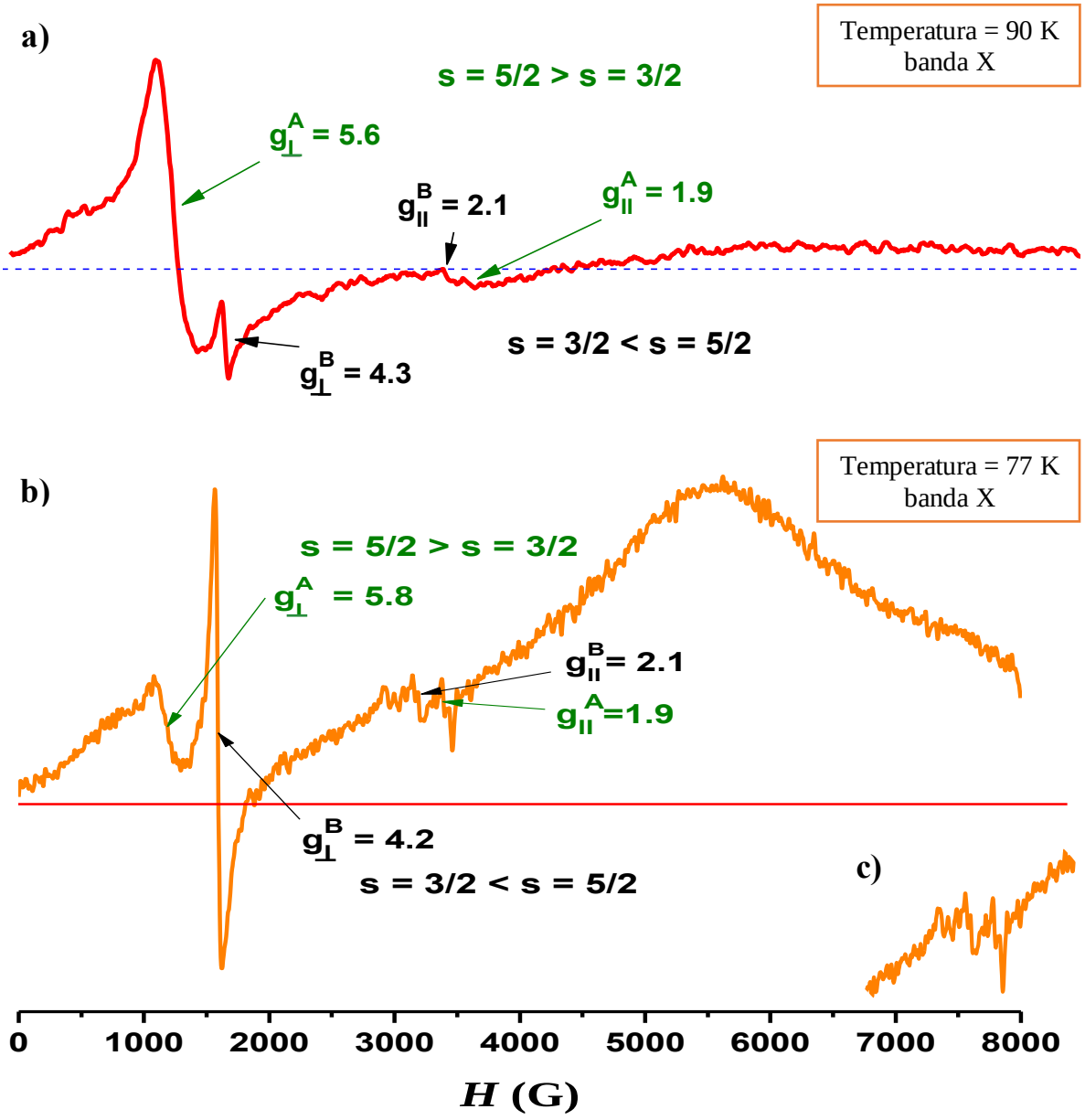


Figura 27. *Espectro de RPE de a)* ***1*** *a temperatura de 90K , b) reacción de* ***1*** *+ H_2O_2 a temperatura de 77 K, ambos en banda X y c) acercamiento a la zona del radical*

En la **Tabla 10** se presentan los datos de la espectroscopía de RPE del producto de oxidación de **1-Fe(IV)** + H_2O_2 comparado con los valores de g presentes en **1**. También se muestra la intensidad relativa de la ecm para la especie A ($s = 5/2 > s = 3/2$) para **1-Fe(IV)** + H_2O_2 y **1** en donde se observa que para **1-Fe(IV)** + H_2O_2, la especie A disminuye hasta el 15.66%; la ecm para la especie B ($s = 3/2 > s = 5/2$) para **1-Fe(IV)** + H_2O_2 aumenta hasta el 84.33%, permitiendo ver una mce con mayor población de $s = 3/2 > s = 5/2$.

Tabla 10. *Datos de la espectroscopía de RPE para **1-Fe(IV)** comparados con los de **1***

Complejo	$g_{\perp}^{A}$	$g_{\perp}^{B}$	g_{II}^{A}	g_{II}^{B}	Intensidad relativa %
[(pp-Fe^{IV}=O) (tpe)]$^{\cdot+}$	5.8	4.2	1.9	2.1	$g_{\perp}^{A}$ = 15.66% , $g_{\perp}^{B}$ = 84.33%
1	5.6	4.3	1.9	2.1	$g_{\perp}^{A}$ = 77.72% , $g_{\perp}^{B}$ = 22.22%

Discusión. Las peroxidasas cuando reaccionan con H_2O_2 y guayacol, usualmente forman radicales libres estables que se convierten en dímeros o trímeros (POG´s). La alta velocidad de la reacción dificulta observar la formación del intermediario Compuesto I en UV-Vis; sin embargo, algunas espectroscopías, tales como la RPE han sido utilizadas debido a la sensibilidad que presentan para poder detectar la formación de estas especies. Uno de los retos más difíciles en el mecanismo catalítico de peroxidasas ha sido la demostración de la existencia de los compuestos intermediarios, Compuesto I y Compuesto II. Estos intermediarios tienen un ferril Fe(IV)=O a alto espín y un radical libre. Además, los espines desapareados del ion Fe(IV) con $s = 1$ son acoplados con el radical con $s = 1/2$, dando un espín total de $S = 3/2$, lo que permite ver el intermediario por una señal en RPE con $g \sim 4$ [Hernández-Anzaldo et al., 2016].

Berglund *et al.*, reportaron las estructuras del Compuesto I y Compuesto II de la peroxidasa a alta resolución capturados por espectroscopía de rayos x en experimentos separados [Berglund et al., 2002].

Al hacer reaccionar a **1** con H_2O_2 se forma el intermediario Compuesto I que tiene un radical catiónico ferrilo $[Fe(IV)=O]^{+\cdot}$ con una señal del radical libre. Se observa la presencia de una especie con Fe(III) de alto espín $s = 5/2$. Además de otra especie con $s = 1/2$ que contiene el Fe(III) [Cammack & Cooper, 1993].

3.5 Determinación de la actividad antioxidante por método del DPPH

La autooxidación lipídica es un proceso radical implicado en una reacción en cadena que incluye etapas de inducción, propagación y terminación. Durante el periodo de inducción se forman los radicales alquilo y peroxilo. Estas especies químicas altamente reactivas producen hidroperóxidos (ROOH) durante la fase de propagación. La terminación es la asociación de dos radicales juntos para formar productos más estables. Toda la secuencia es responsable de las alteraciones organolépticas y nutricionales debidas a la formación de compuestos volátiles de mal sabor debido a la degradación de ROOH y la desaparición de los ácidos grasos esenciales. Los radicales formados están involucrados en los procesos de envejecimiento de tejidos y patologías como el cáncer o las enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, es necesario proteger los alimentos y los tejidos humanos contra los radicales libres mediante antioxidantes de origen natural o sintético [Bondet et al., 1997]. Estos antioxidantes también son producidos por el sistema biológico y se producen naturalmente en muchos alimentos [Kedare & Singh, 2011].

El DPPH es un radical libre y estable; en su estructura tiene un electrón en un orbital molecular de no enlace que se deslocaliza dentro de los orbitales moleculares π del anillo aromático, confiriéndole un color violeta obscuro [Kedare & Singh, 2011]. El DPPH absorbe radiación UV-Vis en $\lambda_{máx}$ = 514 nm y cuando está frente a un antioxidante, pierde la intensidad de la señal de transición de electrón ya que la concentración de DPPH disminuye mientras aparece su forma reducida DPPH-H provocando un cambio de color [Baca-Solis et al., 2016].

El método de radicales libres de DPPH es una medida de la eficiencia de un compuesto químico que actúa como antioxidante a temperatura ambiente y así es eliminado el riesgo de degradación térmica de la prueba de las moléculas [Bondet et al., 1997]. Aunque el DPPH existe como un radical libre y es estable en disolución de metanol, el resultado preliminar de Klen *et al.* (2012) muestra una significante absorbancia decreciente (60-70%) durante 1 hora de cinética en UV-Vis. Compararon sus resultados cinéticos con luz UV-Vis y Vis, revelando una dependencia de la luz UV a la degradación de DPPH en dilución de metanol durante la detección con lampará UV-Vis; sin embargo, esto no ocurre cuando solo la lámpara de luz visible está encendida [Klen & Vodopivec, 2012; Kedare & Singh, 2011].

La concentración antioxidante necesaria para decrecer la concentración inicial de DPPH en un 50% (IC_{50}) es usada para comparar las capacidades antioxidantes de diferentes compuestos o extractos de muestras naturales [Pyrzynska & Pękal, 2013].

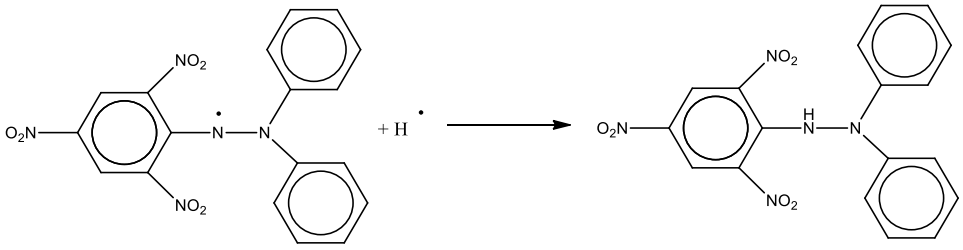
Con una curva de variación de concentración del compuesto de coordinación se puede obtener el IC_{50} que indica la concentración necesaria para reducir al DPPH al 50% y permitirá comparar con los fármacos existentes. Para reacciones enzimáticas esta ecuación es **Ecuación 13**:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \qquad \textbf{Ecuación 13}$$

donde K_i es la afinidad de unión del inhibidor, IC_{50} es la fuerza funcional del inhibidor, [S] es la concentración fija de la substancia y *Km* es la concentración del sustrato cuando se tiene la actividad enzimática máxima y es la concentración que corresponde a la mitad de la velocidad máxima. El porcentaje de la eliminación de radicales DPPH es calculado de la **Ecuación 14** [Kedare & Singh, 2011]:

% de eliminación de radicales DPPH= $[(Abs_{control}-Abs_{muestra})/Abs_{control}] \times 100$ **Ecuación 14**

La actividad antioxidante de **1** nos informará de su capacidad para aceptar el electrón desapareado del DPPH para transformarlo en una molécula, **Figura 28**.



Difenilpicrilhidrazil (radical libre) Difenilpicrilhidrazil (no radical)

Figura 28. *DPPH como radical libre y DPPH como molécula diamagnética* [Kedare & Singh, 2011; Pyrzynska & Pękal, 2013]

Resultados. Se probó si había reacción entre el DPPH y el MeOH ya que esto podría interferir en la reacción con **1**. Después de dos horas de reacción se observó en los espectros de UV-Vis la disminución en intensidad de la banda característica de DPPH en 511 nm y la formación de una nueva banda con $\lambda_{máx}$ en 426 nm, **Figura 29**. Esto indicó que el MeOH reacciona con el DPPH pero no directamente, ya que el experimento se realizó con la lámpara UV encendida y esto provocó la oxidación del DPPH lo que interfirió en la reacción; y se pudo observar un punto isosbéstico debido a que el DPPH se oxida al incidir la luz UV sobre

él [Klen & Vodopivec, 2012].

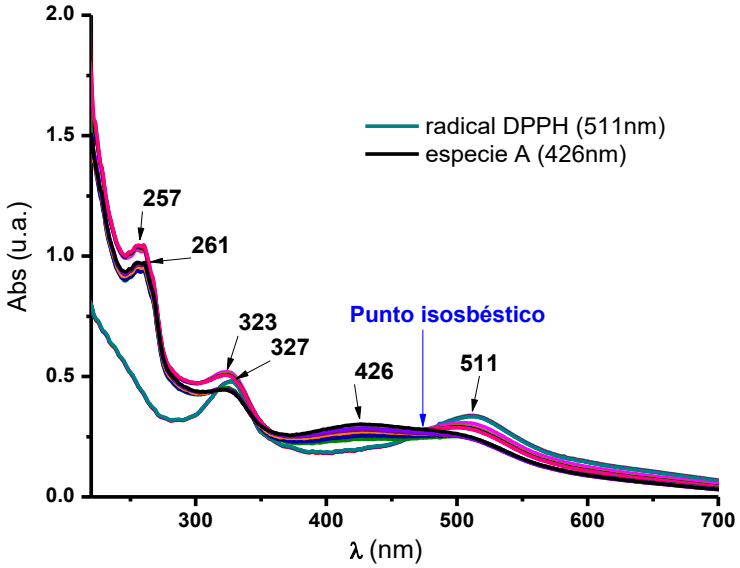


Figura 29. *UV-Vis de DPPH en CH_3OH; tiempo de reacción 22h*

En la prueba del DPPH con **1**, **Figura 30**, se observó que después de 24 h de reacción la banda absorción característica del radical libre de DPPH no desapareció, pero disminuyó indicando que **1** reacciona con el DPPH como antioxidante lentamente. También se observó que el DPPH no oxida al ligante, ya que no se observa un cambio en su $\lambda_{máx}$.

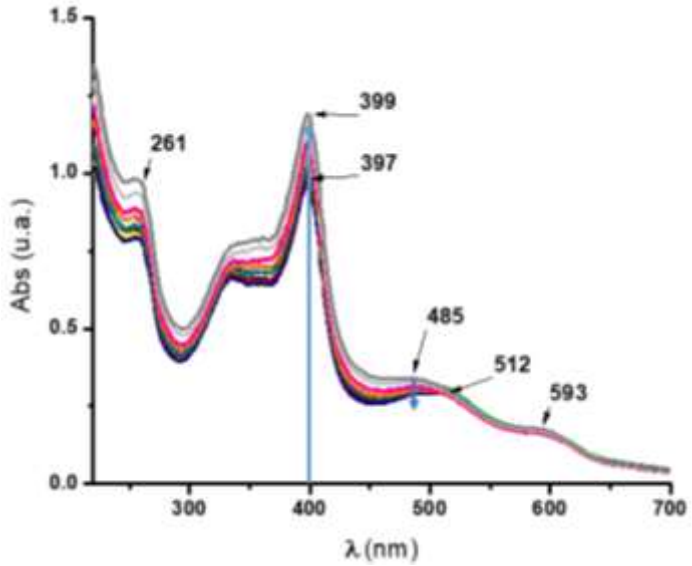


Figura 30. *UV-Vis de **1** con DPPH*
Tiempo de reacción 24h

Tomando en cuenta que la luz UV interfiere en las mediciones el compuesto [Klen &

Vodopivec, 2012], se realizó una gráfica de porcentaje de reducción de **1**, donde se puede observar, **Figura 31**, que **1** reduce al DPPH en un 15 %. Por lo tanto, **1** no es un buen antioxidante ante el DPPH.

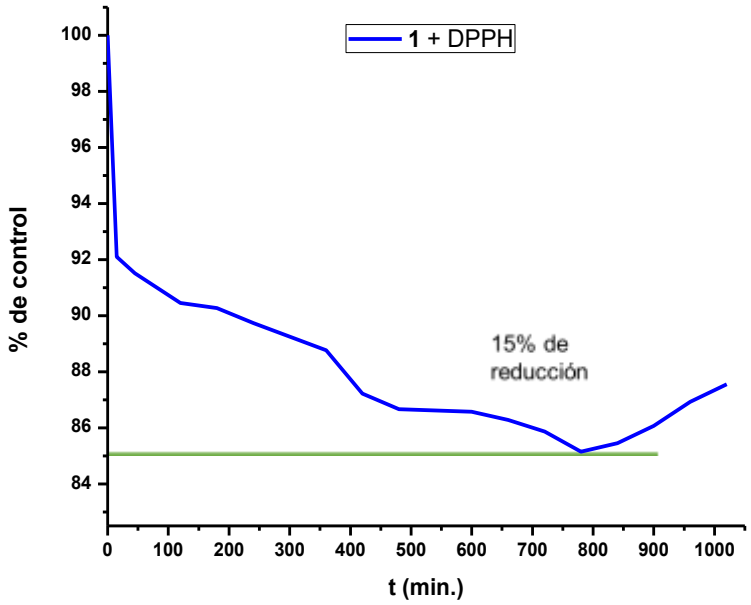
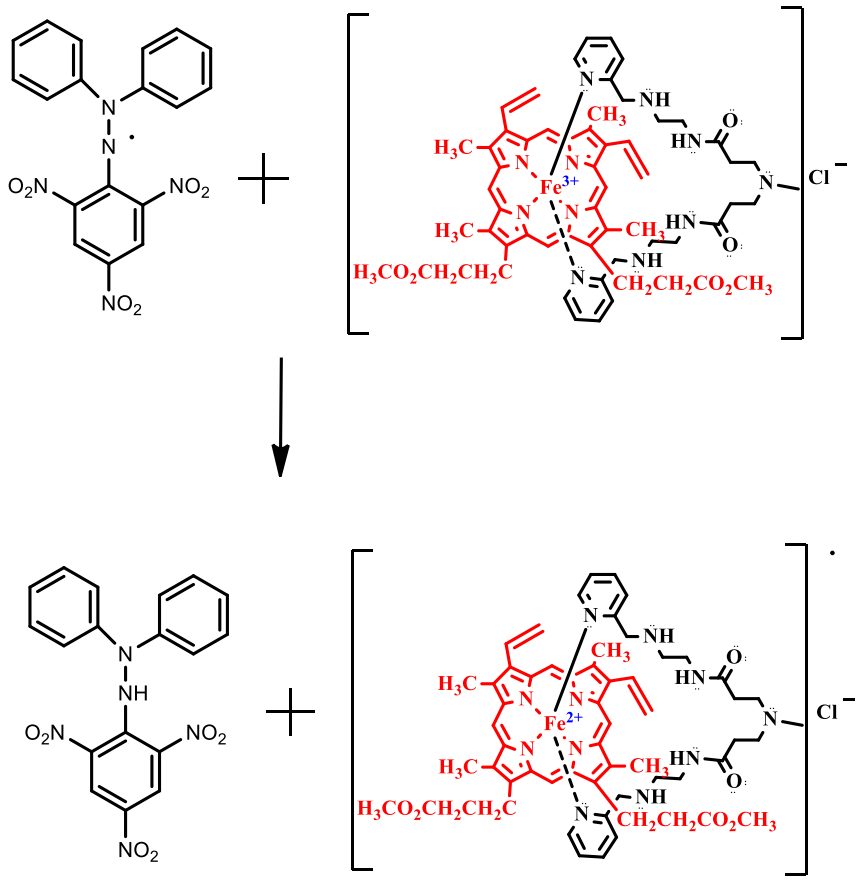


Figura 31. *Porcentaje de reducción de **1** sobre el DPPH*

Discusión. El DPPH es un radical libre estable usado para evaluar la capacidad de varios productos químicos para eliminar radicales libres [Baca-Solis et al., 2016]. Los métodos para medir la capacidad antioxidante y evaluarla son de dos tipos. Si la actividad antioxidante es conocida, se puede elegir un método específico para el compuesto. El DPPH es usado como un estándar externo en RPE por el paramagnetismo conferido por su electrón desapareado [Russell & Box, 1992]. Puede verse por su estructura que, si bien este compuesto puede aceptar un electrón o un átomo de hidrógeno para convertirse en una molécula estable y diamagnética, puede oxidarse solo con dificultad y entonces, irreversiblemente [Blois, 1958].

Con base en lo dicho anteriormente y los resultados obtenidos se puede concluir que **1** reacciona con el DPPH como antioxidante, pero en una pequeña proporción ya que el Fe^{III} del compuesto **1** no puede pasar a Fe^{II} dado que es menos estable, y el potencial redox para Fe^{III} es de +0.77 en comparación con el Fe^{II} que tiene un potencial redox de -0.44, lo que quiere decir, que el Fe^{III} es termodinámicamente más estable, **Esquema 3** [Atkins et al., 2010]. **1** reduce al DPPH en un 15 %. Se observa una fuerte dependencia del uso de luz UV

con la degradación de DPPH en dilución de metanol en las primeras dos horas de reacción.

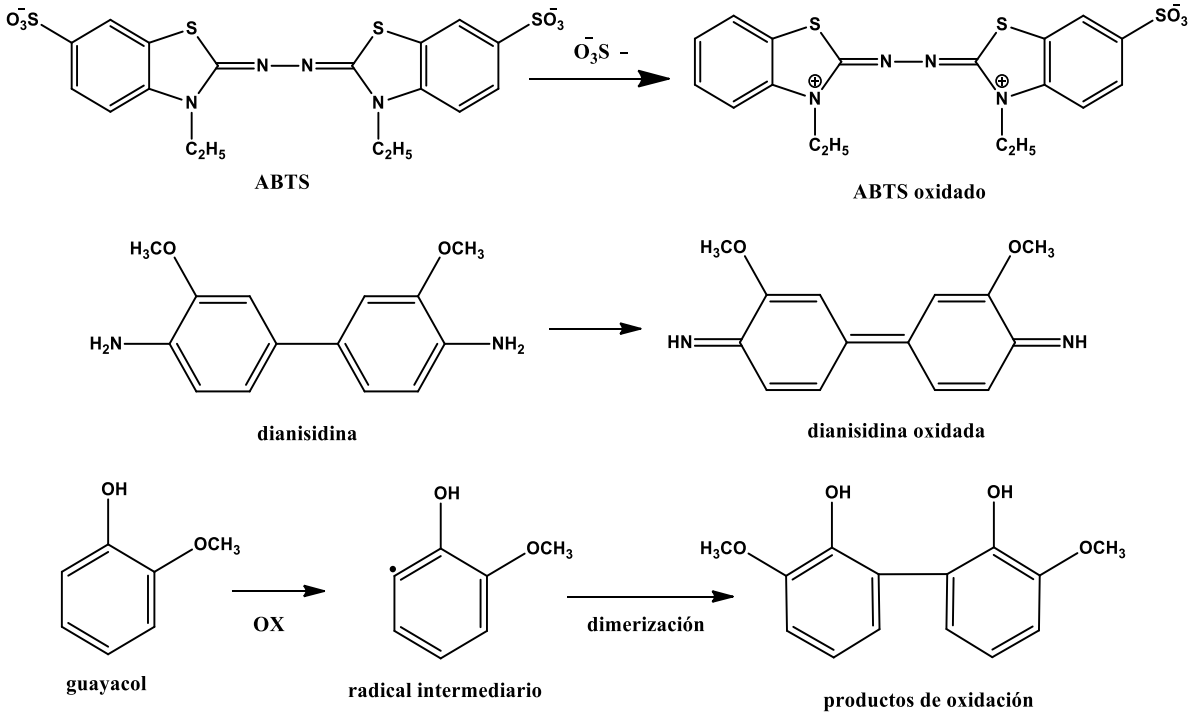


Esquema 3. *Esquema de reacción general de* ***1*** *con DPPH*

3.6 Actividad antioxidante de peroxidasa

Las peroxidasas catalizan la deshidrogenación de un gran número de compuestos orgánicos. Por esto la actividad peroxidasa se puede evidenciar por el descenso de la concentración de H_2O_2 o formación del compuesto oxidado. Es posible usar diferentes sustratos. Un método de ensayo de actividad peroxidasa es el que usa guayacol como donador de hidrógeno. La velocidad de formación de POG es una medida de la actividad peroxidasa. Everse *et al.* (2000), evaluaron ABTS, o-dianisidina y guayacol para ver su capacidad para servir como sustratos para la actividad peroxidasa de las hemoglobinas. Estos tres sustratos fueron elegidos debido a su gran diferencia en estructuras químicas. ABTS es una molécula

relativamente grande y es un azo colorante en el que se oxidan dos nitrógenos aromáticos. Guayacol es un metoxifenol que se oxida a un radical seguido de dimerización, mientras que la o-dianisidina es un derivado de metoxibenzidina en el que los dos grupos amino se oxidan en grupos imino. Las estructuras de estos sustratos y sus productos de oxidación se presentan en el **Esquema 4** [Werner et al., 1970; Decker, 1977].



Esquema 4. *Productos que se obtuvieron de la reacción entre peroxidasa y los diferentes sustratos* [Werner et al., 1970]

Los métodos que usan o- Dianisidina y o-fenilendiamina tienen productos de oxidación que son cancerígenos por ello un sustituto es preferido. El Guayacol produce una mezcla desconocida de productos de oxidación así que las absortividades molares absolutas no pueden ser asignadas; sin embargo, siempre que el guayacol puro sea usado provee un ensayo de relativa confianza. El sustrato más popular es el ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) [Everse et al., 2000; Everse Johnson, 1994].

El ensayo para medir la actividad de la peroxidasa menos dañino y menos caro, que provee una medición directa de la actividad enzimática, es el que usa guayacol y forma un producto coloreado que se observa en la región visible para cuantificar la actividad catalítica. El ensayo usa, en nuestro caso a, **1**, guayacol y peróxido de hidrogeno como sustratos generadores de color. Con concentraciones presentes en suficiente cantidad de **1**, guayacol y

peróxido de hidrogeno, la velocidad de generación del color naranja, en λ = 458 nm es proporcional a la concentración de actividad enzimática en el ensayo [Nicell & Wright 1997).

Resultados. Al reaccionar **1** con guayacol y H_2O_2, se produjo un cambio de coloración de café para **1** a naranja cuando se forman los POG´s. En la **Figura 32** se observa la formación de los POG en una $\lambda_{máx}$ de 458 nm indicando que **1** presenta actividad peroxidasa. También se observan tres puntos isosbésticos que indican que se encuentran en esas longitudes de onda dos especies de la reacción en equilibrio [Russell & Box, 1992]. Esos puntos isosbésticos se deben al equilibrio que hay entre (**1**-Fe(III) + H_2O_2 ⇆ **1**-Fe(IV)-O_2H_2) **1** y la formación del Compuesto I ; así como el equilibrio que existe entre la formación de los productos de oxidación del guayacol (**POG's**) con el guayacol y por último el equilibrio entre **1** y la destrucción del anillo de porfirina [Hernández-Anzaldo et al., 2016].

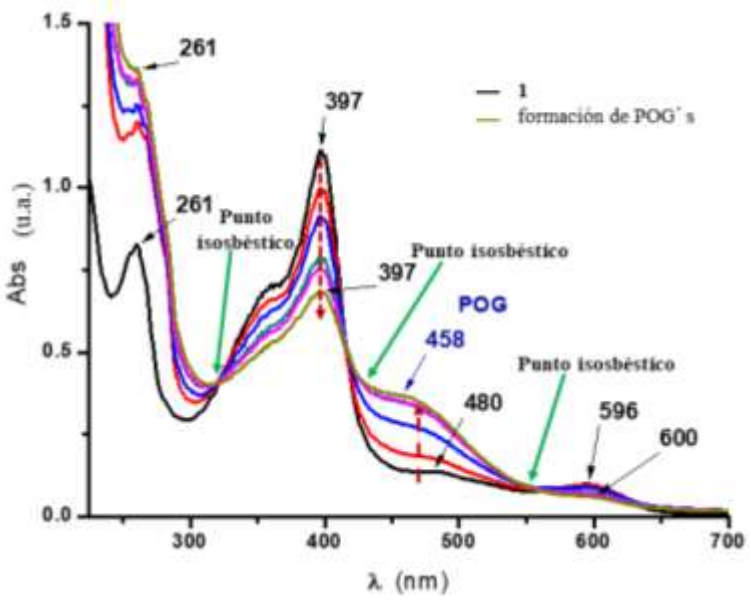


Figura 32. *Espectros de UV-Vis de **1** con Guayacol y H_2O_2*

Cuando se hace reaccionar **1** con H_2O_2, se observa en la **Figura 33**, que al transcurrir la reacción, la banda Soret baja en intensidad debido a la autodestrucción de la porfirina y que las bandas Q se mueven de 483 a 509 nm y de 596 a 627 nm, respectivamente, indicando la formación del Compuesto I, característico de compuestos porfirínicos [Hernández-Anzaldo et al., 2016]. Al transcurrir la reacción se observa que la banda Soret finalmente desaparece, lo que indica que el ligante porfirina se ha autodestruido.

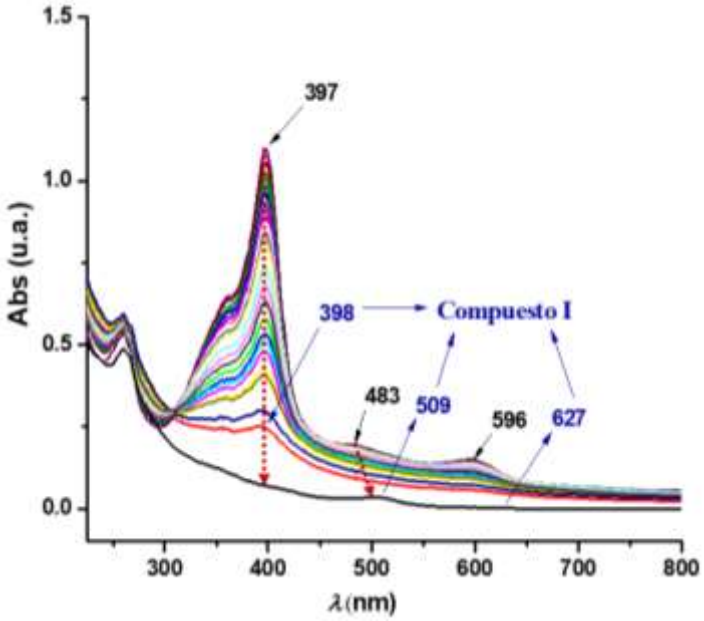


Figura 33. *Espectro de UV-Vis de **1** con H_2O_2*
Tiempo de reacción 6h

Al hacer reaccionar el complejo **1** con guayacol no se producen cambios en el espectro aún haciendo reaccionar la muestra durante 8 h, solo aumenta la absorbancia de la banda del guayacol por la cantidad de guayacol agregado, **Figura 34**.

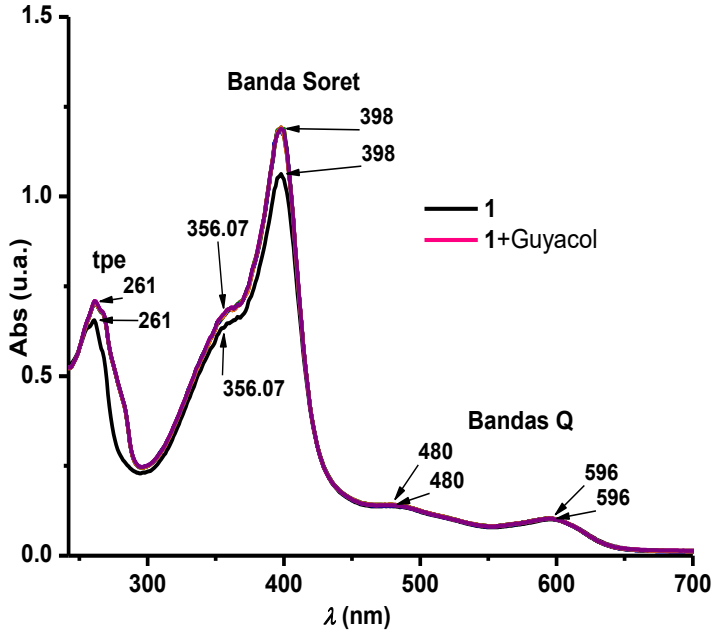


Figura 34. *Espectro de UV-Vis de **1** con Guayacol*
Tiempo de reacción 8h

En el espectro, **Figura 35,** se observa un ligero cambio cuando se mezcla guayacol con el H_2O_2; es decir, el H_2O_2 con el guayacol no conducen a la obtención de los POG.

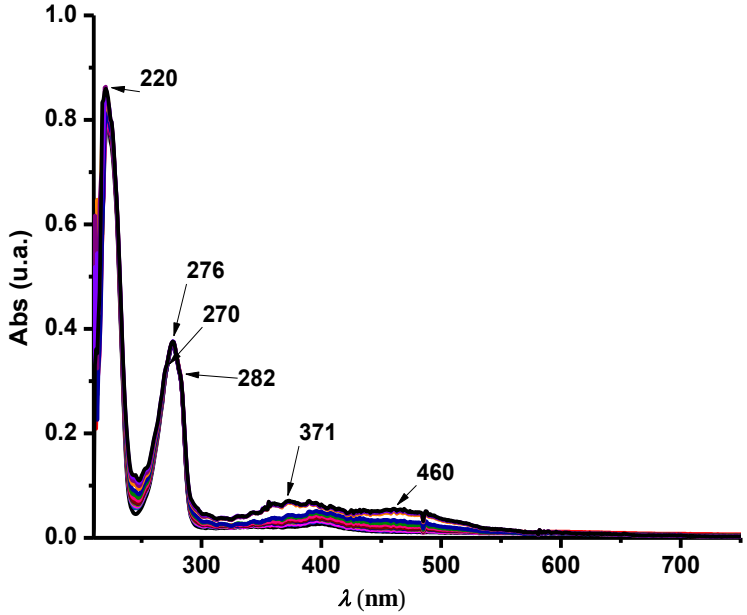


Figura 35. *Espectro de UV-Vis de H_2O_2 con Guayacol*
Tiempo de reacción 6h

En la **Tabla 11** se observan los cambios presentados los espectros de las **Figuras 33-35.**

Tabla 11 *Posición de bandas que se observan en los espectros de UV-Vis*

Porfirina	Sustrato	Hombro nm	Soret nm	Banda Q_1 nm	Banda Q_2 nm	POG nm
1	**(1)**	356.07	397	480	596	----
1	**Guayacol**	356.07	398	480	596	----
1	**POG**	----	397	457	600	458
1	**H_2O_2**	----	----	509	627	----
Guayacol +H_2O_2*		----	----	----	----	----

** En este espectro se observan solo las señales características del Guayacol*

Discusión. Las peroxidasas son enzimas que catalizan la oxidación de un sustrato usando peróxido de una alta especificidad con consideración del sustrato. El peróxido más usado en ambos procedimientos cualitativo y cuantitativo es el peróxido de hidrógeno (Morris 1958). Por esto la actividad peroxidasa se puede evidenciar por la disminución de la concentración de H_2O_2 o por el aumento de la concentración del compuesto oxidado; y es posible usar diferentes sustratos. La velocidad de formación de los POG´s es una medida de

la actividad peroxidasa que muestran ciertos compuestos sintéticos que son utilizados como modelos de peroxidasas. [Werner et al., 1970; Decker, 1977].

Con base en los resultados de las pruebas cualitativas de UV-Vis se puede concluir que **1** presenta actividad como peroxidasa ya que se forman los productos de oxidación del guayacol (POG´s) en una longitud de onda de 458 nm. En la **Figura 33** se observa la formación del Compuesto I ya que las bandas se mueven a menores energías [Hernández-Anzaldo et al., 2016]. De acuerdo a los cálculos de Hückel y Hückel extendido el Fe(IV) está más cerca del anillo porfirínico y hay menos distorsión de la estructura de los intermediarios de reacción Compuesto I y Compuesto II [Zerner et al., 1966].

3.7 Modelo enzimático de Michaelis – Menten

La mayoría de las reacciones que ocurren en los organismos vivos están catalizadas por biomoléculas denominadas enzimas. Las enzimas actúan como catalizadores naturales produciendo un incremento en la velocidad de la reacción por reducción de la barrera energética en el estado de transición de un proceso. En ausencia de estas enzimas la mayoría de las reacciones bioquímicas se llevarían a cabo con velocidades despreciables [Hernández-Anzaldo et al., 2016]. Una enzima es específica en su acción y muchas de ellas catalizan sólo la conversión de un determinado reactivo en un producto, otras catalizan sólo ciertas clases de reacciones como epoxidación de alquenos, oxidación de alcanos. [Levine, 2004; Reyes-Ortega, 1998]. El modelo biomatemático de Michaelis-Menten explica las reacciones catalizadas por enzimas. El modelo propone que la enzima E puede combinarse reversiblemente con el sustrato S para formar el complejo intermediario, ES, que puede descomponerse en uno o varios productos y regresarse para dejar a la enzima y al sustrato libres en su forma original. El complejo E-S produce productos y deja libre a la enzima para dar paso a otro ciclo de la reacción [Bohinski, 1991]. Para una enzima y un sustrato se propone el siguiente mecanismo, **Esquema 5**:

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} P + E$$ **Esquema 5**

donde E es la enzima, S es el sustrato y ES es el complejo enzima-sustrato que se forma a través de una reacción reversible. Ese complejo ES puede formar el producto P y restablecer

a la enzima o puede regresar a E+S.

La ecuación de Michaelis-Menten, **Ecuación 15**, es la ecuación de velocidad para una reacción de un sustrato [S] catalizada por una enzima [E] y reproduce el comportamiento de los datos de velocidad para una enzima.

$$v_0 = \frac{v_{máx}[S]}{K_m + [S]} \qquad \textbf{Ecuación 15}$$

Donde v_0 = velocidad inicial; $v_{máx}$ = velocidad máxima, K_m es la constante de Michaelis-Menten.

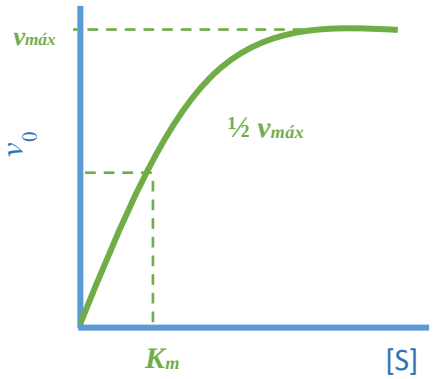


Figura 36. *Gráfica de v_0 en función de [S]*

La velocidad máxima es una expresión del comportamiento enzimático que es de tipo parabólico, **Figura 36**. Cuando $v_0 = v_{máx}$ todos los sitios activos de la enzima están ocupados y no hay moléculas de enzima libres, se dice que la enzima está saturada [Bohinski, 1991]. Una importante relación numérica emerge de la ecuación de Michaelis-Menten en el caso especial cuando $v_0 = 1/2\ v_{máx}$ (50% de saturación), la ecuación de Michaelis-Menten establece, **Ecuación 16**:

$$\frac{v_{máx}}{2} = \frac{v_{máx}\,[S]}{K_m + [S]} \qquad \textbf{Ecuación 16}$$

Dividiendo por $V_{máx}$, **Ecuación 17**:

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \qquad \textbf{Ecuación 17}$$

Resolviendo para K_m, se reduce a, **Ecuación 18**:

$$K_m = [S] \text{ cuando } v_0 = \frac{1}{2} v_{máx} \qquad \textbf{Ecuación 18}$$

La ecuación de Michaelis-Menten puede ser algebraicamente transformada en versiones que son útiles para la determinación de K_m y $v_{máx}$ [Nelson & Cox, 2009; Bohinski, 1991]. K_m también se puede obtener de la **Ecuación 19**:

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \qquad \textbf{Ecuación 19}$$

Un factor que afecta la velocidad de una reacción catalizada por una enzima es la concentración del sustrato, [*S*]. Un experimento en el que se mantiene constante [*S*] y se aumenta la [*E*] se observa que no hay saturación de la enzima y que v_0 α [*E*], **Figura 37**.

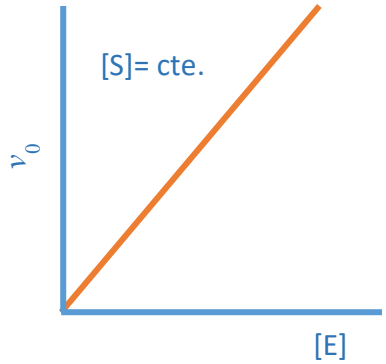


Figura 37. *Gráfica de v_0 en función de [E]*

Sin embargo, estudiando los efectos de la concentración de sustratos es complicado por el hecho de que [*S*] cambia durante el curso de una reacción *in vitro* como el sustrato es convertido a producto. Un enfoque simple en experimentos cinéticos es la medición de la velocidad inicial (v_o), cuando [*S*] es mucho más grande que la concentración de enzima, [*E*]. Si solo el inicio de la reacción es monitoreado y en los primeros 60 s o menos, el cambio en la concentración de [*S*] puede ser limitado a un porcentaje pequeño y puede ser considerado como constante. v_o puede entonces ser examinado como función de la concentración de [*S*] [Nelson & Cox, 2009]. Para la siguiente reacción se mantiene constante la concentración de la [*E*] y se aumenta la [*S*]; se observa que v_0 α [*S*] y que cuando v_0 no cambia la enzima está totalmente saturada, **Figura 36**.

Resultados. Cuando se varió la concentración de **1** se observó una tendencia lineal típica del comportamiento de Michaelis-Menten para enzima. No se observó saturación en el

intervalo de concentraciones ocupadas para este estudio, **Figura 38**. Se hizo un ajuste de los datos con la función de la recta y se obtuvo una desviación estándar de 0.0029.

Al variar la concentración de H_2O_2 y Guayacol, **Figura 39**, se observó la saturación para ambos casos, lo que indica, de acuerdo al comportamiento enzimático de Michaelis-Menten que estos compuestos se comportan como sustratos de enzima. Se obtuvieron curvas que se ajustaron con la ecuación de Michaelis-Menten para enzima: $v_0 = v_{máx}[S] / (K_m+[S])$.

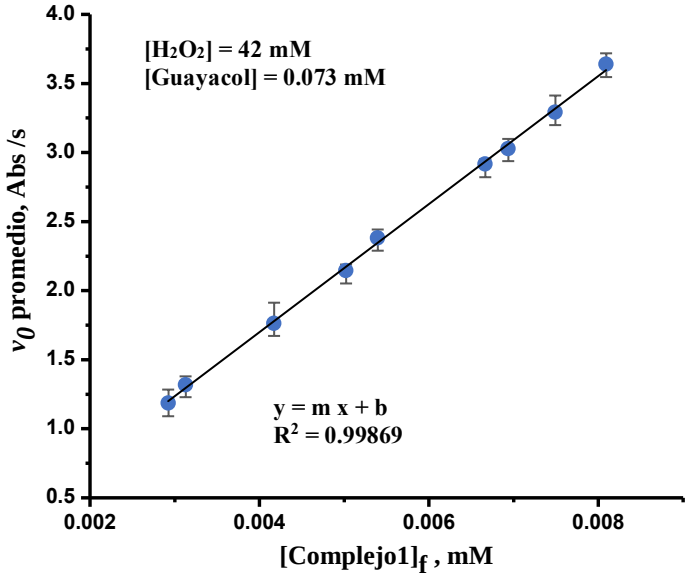


Figura 38. *La gráfica muestra la dependencia lineal de la v_0 con la concentración de **1***

En la **Figura 39** se puede observar una región lineal en la que se muestra una cinética de primer orden en los primeros 10 segundos, es decir, cuando la velocidad depende de la concentración de sustrato y posteriormente se observa una zona asintótica al eje de la variación del sustrato que es de orden cero e indica que la velocidad de reacción se vuelve independiente de la variación de la concentración del sustrato, en ambos gráficos **a)** y **b)**.

Cada punto de las curvas es un promedio de 12 mediciones de v_0 que fueron tratadas estadísticamente con la prueba Q de Dean y Dixon, de cuya prueba se seleccionaron los datos con mayor precisión; estos datos pueden consultarse en el apéndice A. Al valor promedio se le consideró la velocidad inicial representativa con un nivel de confianza del 90% de las tablas presentadas por Dean y Dixon. La desviación estándar fue considerada como el error de las mediciones cinéticas realizadas y tiene valores de 0.0023 y 0.0043 para H_2O_2 y guayacol respectivamente.

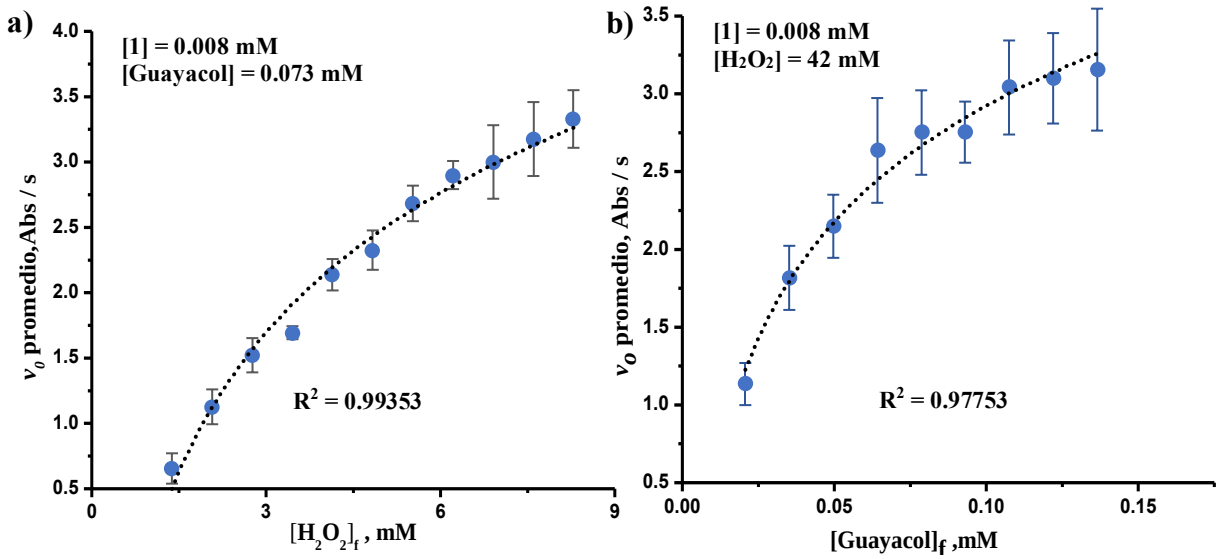
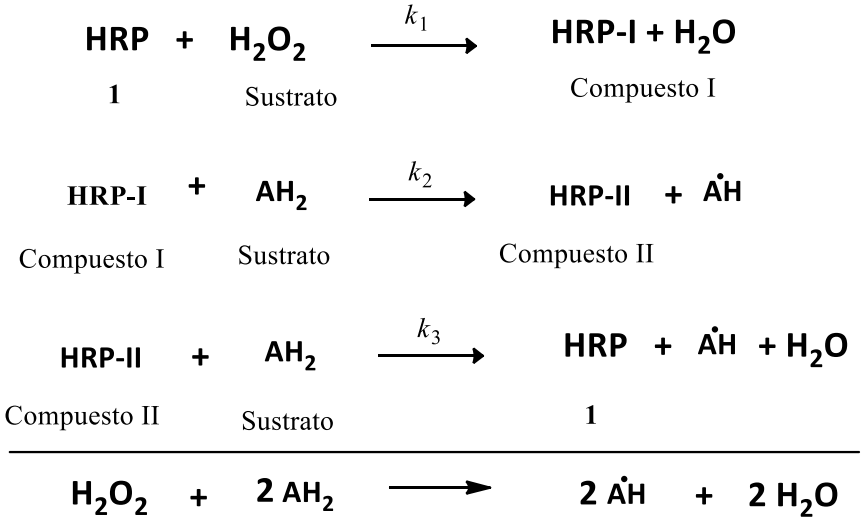


Figura 39. *La gráfica a) muestra la dependencia de v_0 con $[H_2O_2]$cuando se mantienen constantes [1] y [Guayacol]; la gráfica b) muestra la dependencia de v_0 con [Guayacol] cuando se mantienen constantes [1] y $[H_2O_2]$*

3.8 Estudios cinéticos

Las peroxidasas catalizan la reducción de peróxidos en presencia de donadores de electrones (agentes reductores orgánicos e inorgánicos), entre ellas se encuentra la peroxidasa de rábano blanco (HRP) [Arroyo-Abad, 2007].

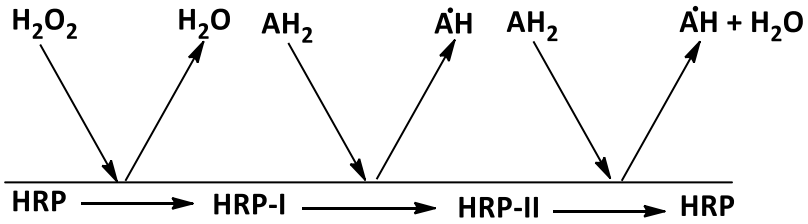
El ciclo normal de la peroxidasa puede ser representado por el **Esquema 6**:



Esquema 6. *Ciclo normal de la peroxidasa* [Everse et al., 2000]

donde HRP-I y HRP-II son los Compuestos I y II (enzima oxidada), AH_2 es un substrato reductor, y ·AH un equivalente de producto oxidado (radical libre). Los productos de ($HA^{\cdot}$) radical libre pueden dimerizar, reaccionar con otra molécula de sustrato o atacar a otras especies causando cooxidación [Everse et al., 2000]. El Compuesto I (HRP-I) es la enzima con dos equivalentes de oxidante y el Compuesto II es la enzima con un equivalente de oxidante.

El **Esquema 7** representa un tipo modificado de cinética ping-pong peroxidasa. Este modelo contempla una enzima, HRP, y dos sustratos, H_2O_2 y guayacol.



Esquema 7. *Cinética ping-pong peroxidasa* [Everse et al., 2000]

En el compuesto estudiado en este trabajo, HRP = **1**; AH_2 = guayacol; HRP-I = [**1**-Fe^{IV}=O]$^{\cdot+}$ radical π-catiónico ferrilo; HRP-II = [**1**-Fe^{IV} =O]$^{+}$ catión ferrilo, $^{\cdot}$AH = guayacol radical. El esquema general por el cual la peroxidasa cataliza la oxidación por peróxido de hidrógeno de una amplia variedad de compuestos orgánicos fue establecida por los trabajos de Chance [Dolman et al., 1975; Chance, 1952], como aparece en el **Esquema 7**.

El modelo de ping -pong de dos sustratos (H_2O_2 y guayacol) y dos productos (H_2O y $^{\cdot}$AH (POG´s)) es utilizado para los estudios cinéticos de los compuestos tipo porfirina-pinza ya que la cinética de estos compuestos indica la desaparición del sustrato [Reyes-Ortega et al., 1998]. El esquema de ping-pong convencional es el siguiente, **Esquema 8**:

$$E + A \rightleftharpoons EA \longrightarrow F + P$$

$$F + B \rightleftharpoons FB \longrightarrow E + Q$$

Esquema 8. *Esquema de ping-pong convencional* [Everse et al., 2000]

donde *E* es la enzima nativa, EA es el complejo enzima sustrato, *F* es la enzima modificada covalentemente, A (H_2O_2) y B (guayacol) son los reactivos, P (H_2O) y Q (POG) los productos

[Everse et al., 2000].

Para analizar los datos de velocidad inicial, se usa la siguiente ecuación:

$$\frac{[E]_0}{v} = \frac{K_A}{k_{cat}}\frac{1}{[A]} + \frac{1}{k_{cat}}\left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right) \qquad \textbf{Ecuación 20}$$

donde $[E]_0$ es la concentración de enzima total, v es la velocidad inicial, K_A y K_B constantes de Michaelis, y k_{cat} la constante de velocidad máxima teórica. La gráfica obtenida de la **Ecuación 20** es llamada gráfica secundaria. La **Ecuación 20** puede ajustarse a la ecuación de la línea recta; donde $[E]_0/v = y$, $K_A/k_{cat} = m$, $1/[A] = x$, $1/k_{cat}\,(1 + K_B/[B]) = b$. Si se obtienen tres concentraciones de B en las que la velocidad no cambia, **Figura 39 b**, y también se mantiene constante la concentración de **1**, entonces una gráfica de $[E]_0 / v$ en función de $1 / [A]$ es una línea recta para cada una de estas tres concentraciones de B, **Figura 40**.

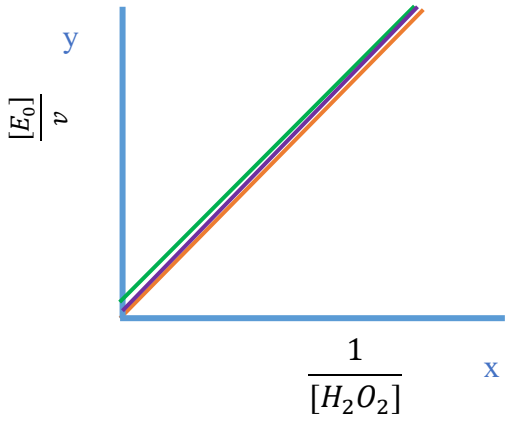


Figura 40. *Gráfica de $[E_0]/v$ en función de $1/H_2O_2$ para las tres concentraciones constantes de guayacol*

Así, la cinética de ping-pong es también conocida como cinética de líneas paralelas. El intercepto primario (I.P.) al eje de las abscisas de estas líneas rectas paralelas son dadas por la **Ecuación 21** y es cuando 1/[A] es cero:

$$I.P. = \frac{[E_0]}{v} = \frac{K_B}{k_{cat}}\frac{1}{[B]} + \frac{1}{k_{cat}} \qquad \textbf{Ecuación 21}$$

Las gráficas obtenidas por la **Ecuación 21** son llamadas gráficas primarias [Everse et al., 2000].

Resultados. De acuerdo con el modelo de cinética ping-pong convencional fue posible obtener las gráficas primarias paralelas que caracterizan a este modelo. Las gráficas

primarias para **1**, **Figura 41**, se construyeron a partir del análisis de datos de v_0 que fueron obtenidos experimentalmente y tratados estadísticamente mediante la prueba Q de Dean y Dixon y cuyos valores se pueden apreciar en el apéndice A. Estos datos se ajustan a la **Ecuación 20** para obtener cada una de las 3 líneas paralelas. De las 3 líneas paralelas graficadas se obtuvieron 3 interceptos primarios (I.P.) en la ordenada para cada valor de [Guayacol] cuando $1/H_2O_2$ es 0.

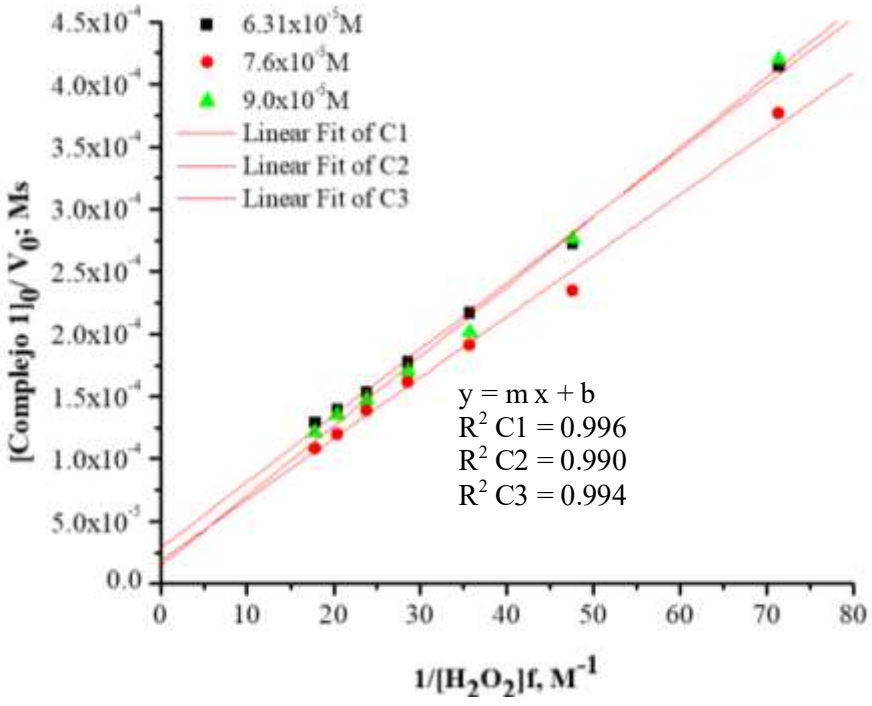


Figura 41. *Gráficas primarias para 1*

Cuando se graficaron los valores de I.P. en función de 1/[Guayacol], **Figura 42**, se obtienen 3 puntos que se ajustan a una línea recta mediante la **Ecuación 21**. De la **Ecuación 21 en** la gráfica secundaria fue posible calcular k_{cat} en el punto en el que 1/[Guayacol] = 0; una vez obtenido el valor de k_{cat}, fue posible calcular $K_{Guayacol}$ a partir de la pendiente de dicha ecuación. Con esta información y a partir de la pendiente de la gráfica primaria $K_{H_2O_2}$ / k_{cat} se obtiene el valor de $K_{H_2O_2}$.

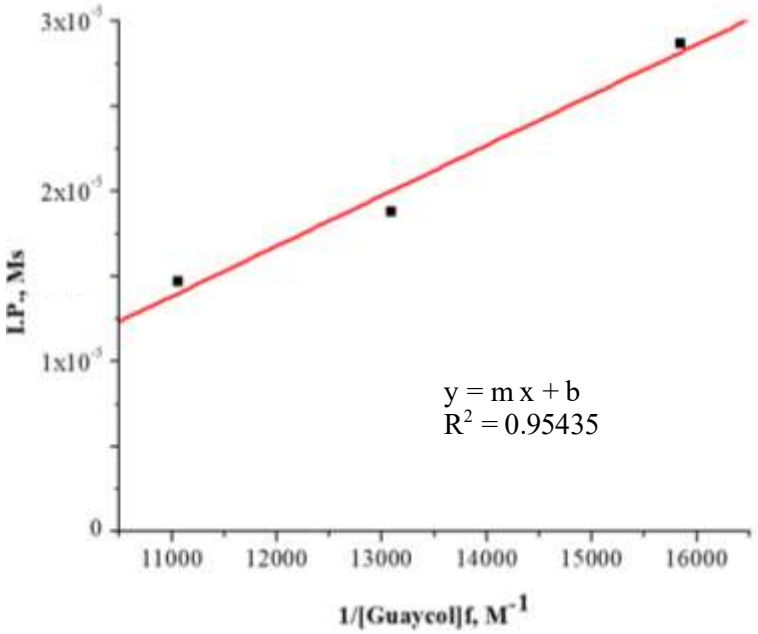


Figura 42. *Gráfica secundaria para el complejo **1***

En la **Tabla 12** se presentan los valores de k_{cat} y constantes de Michaelis-Menten obtenidas en este trabajo para **1**.

Tabla 12. *Constantes de Michaelis-Menten y velocidad máxima teórica*

Complejo	$K_{H_2O_2}$, M	$K_{guayacol}$, M	k_{cat}, $M^{-1}s^{-1}$
[**1**]	2.80×10^{-1}	1.58×10^{-4}	5.35×10^{4}

En la **Tabla 13** se aprecian las comparaciones de las constantes de Michaelis-Mentes y la constate de velocidad máxima teórica obtenidas en este trabajo y las obtenidas en trabajos reportados anteriormente; así como los porcentajes de poblaciones de ecm A y ecm B.

Tabla 13. *Comparación de las constantes de Michaelis-Menten y velocidad máxima teórica*

Complejo	$K_{H_2O_2}$, M	$K_{Guayacol}$, M	k_{cat}, $M^{-1}s^{-1}$	ecm A $s = 5/2$	ecm B $s = 3/2$
Peroxidasa (HRP)[a]	1.3×10^{-1}	------	1.8×10^{7}	------	------
[(tpe)(pp)]Fe(III)[b]	2.8×10^{-1}	1.6×10^{-4}	5.4×10^{4}	74% [69.5% (s = 5/2), 30.5% (s =3/2)]	26% [11.1% (s = 5/2), 88.9% (s =3/2)]
pp-Fe(III) [c]	1.9×10^{-2}	2.45×10^{-4}	1.3×10^{4}	75.5% [> 91.8% (s = 5/2), < 8.2% (s =3/2)]	24.5% [29.9% (s = 5/2), 70.01% (s =3/2)]
[(picdien)(pp)]Fe(III)[c]	9.1×10^{-2}	2.3×10^{-3}	7.6×10^{6}	23% [56% (s = 5/2), 44% (s =3/2)]	77% [< 8% (s = 5/2), > 92% (s =3/2)]
[(picdipropilen)(pp)]Fe (III)[d]	1.2×10^{-1}	3.5×10^{-4}	1.0×10^{3}	> 70% [70% (s = 5/2), 30% (s =3/2)]	< 30% [10% (s = 5/2), 90% (s =3/2)]
[(picocta)(pp)]Fe(III)[e]	2.3×10^{-2}	1.3×10^{-4}	4.6×10^{2}	85.6% [73.3%(s = 5/2), 26.7% (s =3/2)]	14.4% [< 8.2% (s = 5/2), > 91.8% (s =3/2)]

[a] Dolman et al. 1975
[b] Este trabajo
[c] Reyes-Ortega et al. 1998
[d] Sánchez-Sandoval et al. 2003
[e] Arroyo-Abad 2007

Con base en la discusión y resultados se concluye que **1**, de acuerdo con el modelo de Michaelis – Menten, presenta comportamiento de enzima, y H_2O_2 y guayacol presentan comportamiento de sustratos. **1** tiene un valor de velocidad máxima teórica de k_{cat} **= 5.38 x** 10^4 $M^{-1}s^{-1}$, que es tres órdenes de magnitud menor que la constante de velocidad máxima teórica presentada en la peroxidasa de rábano blanco [Dolman et al., 1975]. Se comprobó que el ligante tpe aumenta ligeramente la actividad catalítica de **1** con respecto a su precursor, que reporta constante de velocidad máxima teórica de $k_{cat} = 1.32 \times 10^4$ $M^{-1}s^{-1}$ [Reyes-Ortega, 1998]. Los valores de las constantes de Michaelis-Menten concuerdan con las afinidades de estos sustratos ante los diferentes compuestos porfirina-pinza y con respecto a la HRP, ya que se presenta una mayor afinidad para guayacol que para H_2O_2 dado que se necesita menos cantidad de guayacol que de H_2O_2 en la reacción llevada a cabo.

Con la información obtenida en la **Tabla13** se puede hacer una correlación entre la población de ecm con la actividad catalítica como peroxidasa, en donde se muestra que cuando aumenta

el ecm B que es la especie que tiene una población con espín $s = 3/2 > s = 5/2$ se tiene una mayor actividad catalítica como peroxidasa. Se puede observar que en **1** aumenta el ecm B y tiene una mayor actividad catalítica que su precursor. También es posible establecer que, para el ecm, $s = 3/2, 5/2$, el Fe(III) se encuentra fuera del plano de la porfirina, entre 0.03 y 0.04 nm. También se puede correlacionar la posición del Fe(III) por medio de la fuerza de campo ligante, del ligante axial. El campo ligante del tpe favorece poblaciones con ecm, $s = 3/2, 5/2$, que favorecen una mayor actividad catalítica como peroxidasa, sin embargo, se encuentran en menor porcentaje con respecto a otros compuestos porfirina-pinza.

El mecanismo de reacción que se propone para **1** es el siguiente: uno de los piridilos del ligante tpe se separa momentáneamente del Fe(III) permitiendo que entre la forma no ionizada del H_2O_2, que es el reactivo inicial. Uno de los hidrógenos del H_2O_2 se une débilmente al nitrógeno del piridilo del tpe; formando el enlace N···H-O-O-H, provocando que el enlace H-O, que está enlazado al N se rompa heterolíticamente. La ruptura heterolítica provoca la formación del intermediario, Fe(III)-O-O-H, que involucra el flujo electrónico del sitio distal del hemo al ion férrico. El β-O del intermediario Fe(III)-$^{\alpha}$O-$^{\beta}$O-H, ataca al H del piridilo, formando el enlace Fe(III)-$^{\alpha}$O-$^{\beta}O^{+}$-H_2; debido a que el Fe y el α-O son electronegativos y el β-O está cargado positivamente, hace difícil la ruptura heterolítica del O-OH_2. Tanto el Fe(III) como el α-O usan un electrón para formar un enlace ferrilo, Fe(IV)=O, y de esta manera sale H_2O como buen grupo saliente. En la formación del grupo ferrilo están implicados 5 electrones para el oxígeno y 4 electrones *d* de la formación del Compuesto I, como se muestra en el **Esquema 9** inciso **a)**. Una vez que se forma el Compuesto I, éste reacciona con el guayacol.

El guayacol reacciona con un grupo básico que contiene dos pares de electrones libres para desprotonarse, quedando el O del guayacol con un par de electrones; posteriormente el Guayacol le dona un electrón al O del grupo ferrilo de la porfirina, formándose el Compuesto II catión ferrilo y el guayacol oxidado. El Compuesto II reacciona con otro equivalente de guayacol y con un grupo básico, desprotonandolos para formar un buen grupo saliente, reducir el Fe(IV) a Fe(III) para formar **1** y obtener los POG´s debido a la dimerización del guayacol oxidado, **Figura 43**, como se muestra en el **Esquema 9** inciso **b)**.

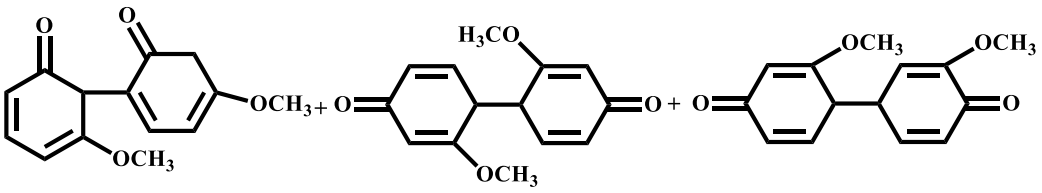
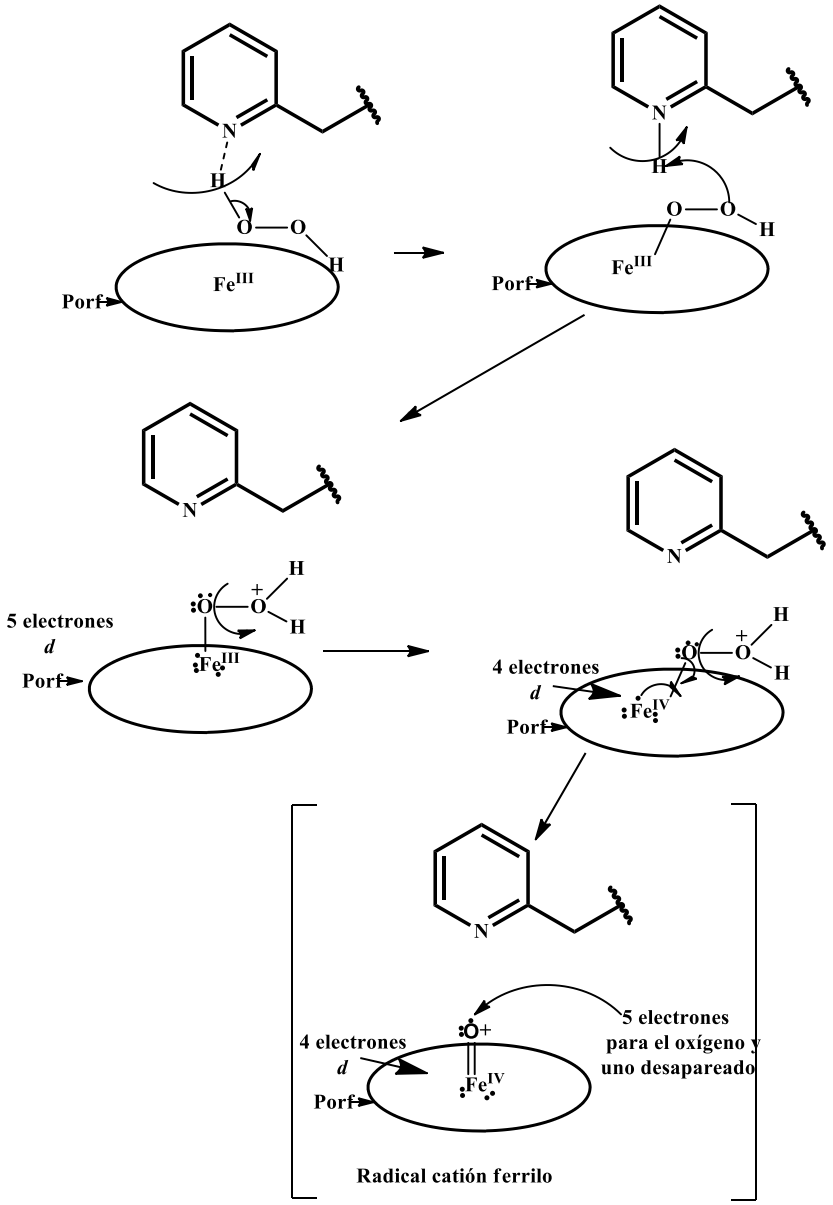
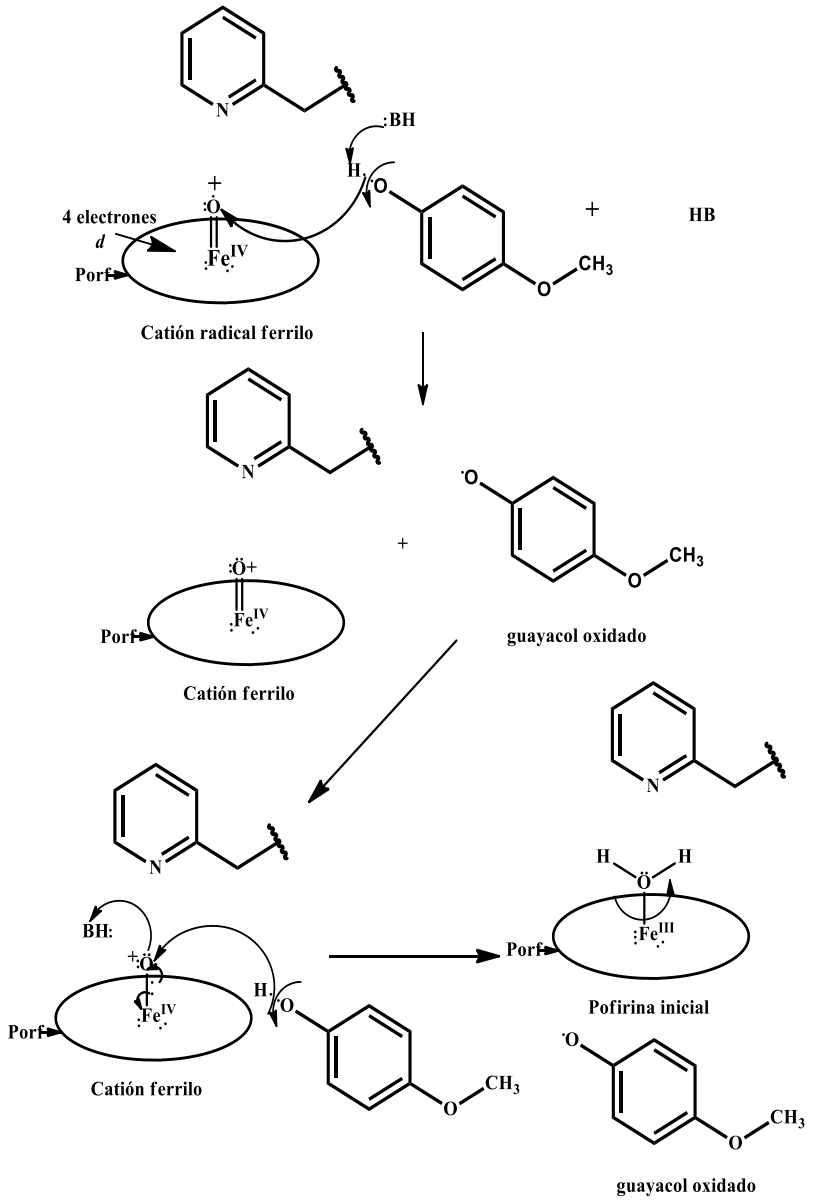


Figura 43. *Productos de oxidación del Guayacol POG´s.*

a)



b)



Esquema 9. *Propuesta del mecanismo de reacción para **1**, a) formación del Compuesto I; b) formación del Compuesto II y posterior formación de la porfirina de partida, **1***

CAPÍTULO IV

Conclusiones

- Este trabajo contribuyó al estudio de los modelos artificiales enzimáticos de peroxidasas, ayudando a complementar el estudio del dimetilésterprotoporfirinato-Fe(III) con los diferentes ligantes reportados en este equipo de trabajo y proponer el comportamiento enzimático dependiente del ligante.
- La metodología para la obtención del clorodimetilésterprotoporfirinato-Fe(III) coordinado al ligante dendrítico tpe no ha sido reportado antes.
- La constante de actividad catalítica es tres órdenes de magnitud menor que la constante de actividad catalítica reportada para peroxidasa de rábano blanco.
- El porcentaje de la especie con mayor $s = 3/2$ en la mezcla cuántica de estados de espín determina la actividad de peroxidasa y se observó que **1** presenta una mayor actividad catalítica que su precursor, ya que aumentó el porcentaje de población $s = 3/2$ en la mce.
- De acuerdo con estudios previos de compuestos similares al obtenido se concluye que la especie con Fe(III) que contenga ecm con una mayor proporción de $s = 3/2$ que $s = 5/2$ mostrará una mayor actividad catalítica como peroxidasa.
- La longitud del ligante influye en la actividad catalítica, ya que ligantes de cadena más corta y con aminas, como el picdien, tienen una mayor actividad catalítica que los ligantes de cadena larga y con amidas en su estructura como el ligante del presente trabajo.

Bibliografía

Abbasi, E. et al., 2014. *Nanoscale Research Letters*, 9(1), p.247.

Alben, J.O., 1978. Infrared Spectroscopy of Porphyrins. D. Dolphin, ed. *The porphyrins*. New York, pp. 323–335.

Arroyo-Abad, U., 2007. *Estudios cinéticos de los complejos picocta cloroproto, cloromeso y clorodeuteroporfirinato dietiléster Fe(III) como modelos de enzimas peroxidasa*. Tesis de maestría. BUAP.

Atkins, P. et al., 2010. *Inorganic Chemistry* 5a., Great Britain: Oxford University Press.

Baca-Solis, E., Flores-Alamo, M. & Ramírez-Rosales, Daniel Zamorano-Ulloa, Rafael Anzaldo-Hernández, S.& O.-R.Y., 2016. *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*, 7(3), pp.1–7.

Berglund, G. et al., 2002. *Nature*, 417(May), pp.463–468.

Blois, M., 1958. *Nature*, 181, pp.1199–1200.

Bohinski, R.C., 1991. *Bioquímica* 5ta ed., Pearson Educación.

Bondet, V., Berset, C. & Chimie, L. De, 1997. *LWT - Food Science and Technology*, 30(6), pp.609–615.

Budd, D.L. et al., 1979. *American Chemical Society*, 6815(1973).

Cammack, R. & Cooper, C.E., 1993. Electron paramagnetic resonance spectroscopy of iron complexes and iron-containing proteins. *Methods in Enzymology. Metallobiochemistry Part D*, 227, pp.353–384.

Cervantes-Mejía, V. et al., 2014. *American Journal of Analytical Chemistry*, (November), pp.1090–1101.

Chance, B., 1952. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 41(2), pp.416–424.

Coryell, C.D., Stitt, F. & Pauling, L., 1937. *Journal of the American Chemical Society*, 59(4), pp.633–642.

Dean, R.. B. & Dixon, W.J., 1951. *J. Anal. Chem.*, 23(4), pp.636–638.

Decker, L.A., 1977. *Worthington Biochemical Corporation*, p.66.

Dolman, D. et al., 1975. *Canadian Journal of Biochemistry*, 53(5), pp.495–501.

Everse, J.; Johnson, C.M.. M.A.M., 1994. *Hemoglobins* Elsiever.,

Everse, J., Everse, E.K. & Grisham, B.M., 2000. *Peroxidases in Chemistry and Biology Volume II Johannes*, Boston: CRC Press.

Frydman, R.B., Frydman, B. & Valasinas, A., 1979. Protoporphyrin: Synthesis and Biosynthesis of Its Metabolic Intermediates. In Dolphin, ed. *THE PORPHYRINS*. Academic Press.

Giovannetti, R., 2012. The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins. In *Macro To Nano Spectroscopy*. InTech, p. 448 pages.

González-Coronel, V., 2002. *Estudios del complejo protoporfirina-Fe(III)-picpenta*. BUAP.

Gouterman, M., 1973. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 206(OCT22), pp.70–83.

Gouterman, M., 1978. *The Porphyrins Volume III* D. Dolphin, ed., New York: Academic Press.

Gouterman, M., Wagnière, G.H. & Snyder, L.C., 1963. *Journal of Molecular Spectroscopy*, 11(1), pp.108–127.

Griffith, J.S., 1956. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 235(1200), pp.23–36.
H. C. Longuet-Higgins, C. W. Rector & J. R. Platt, 1950. *J. Chem. Phys.* 16,1174.
Harris C.D., 2007. *Analisis Químico cuantitativo* 3era ed., California: Reverté.
Hernández-Anzaldo, Samuel Abad-Arroyo, U. et al., 2016. Spectroscopic and Kinetic Characterization of Pinch-Porphyrin-Iron (III) Reaction Intermediate. , (June), pp.2–13.
Huheey, J.E., Keiter, E.A. & Keiter, R.L., 1997. Química inorgánica. *Principios de estructura y reactividad*, 4, pp.148–162.
Iizuka T. & Kotani, M., 1969. *Biochim.Biophys.*, (181), pp.86–275.
Janson, T. & Katz, J., 2003. *Nuclear Magnetic Resonance of diamagnetic metalloporphyrins* D. Dolphin, ed.,
Kadish, K., Guilard, R. & Smith, K.M., 2012. In *The Porphyrin Handbook: Phthalocyanines: Properties and Materials*. pp. 134–135.
Kedare, S.B. & Singh, R.P., 2011. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), pp.412–422.
Klen, T.J. & Vodopivec, B.M., 2012. *Food Analytical Methods*, 5(4), pp.781–783.
León-García, A., 2005. *Estudios cinéticos de los complejos [(picpenta)(mesoporfirinato-dimetiléster)]Fe(III) y [(picpenta)(deuteroporfirinato-dimetiléster)]Fe(III) como modelos de enzimas peroxidasa*. Tesis de maestria. BUAP.
Levine, N.I., 2004. *Fisicoquímica Volumen 2* 5a ed., España: Mc Graw Hill.
Li, W.S. & Aida, T., 2009. *Chemical Reviews*, 109(11), pp.6047–6076.
Linus, P.C.D.C., 1936. *Proc.N.A.S.*, 22, pp.210–216.
Mabbs, F.E., 1993.. *Chemical Society Reviews*, 22(5), p.313.
Macomber, R.S., 1998. *Physics Today*, 52(1), p.68.
Maltempo, M.M., 1974. *The Journal of Chemical Physics*, 61(7), pp.2540–2547.
Maltempo, M.M. & Moss, T.H., 2009. *Quarterly Reviews of Biophysics*, (1976), pp.181–215.
Morris, H.J., 1958. *Food Preservatives*, 6(5), pp.383–384.
Nakamoto, K., 2009. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry*,
Nelson, D. L.; Cox, M.M., 2009. *Princípios de Bioquímica*, España: Omega.
Nicell, A.J. & Wright, H., 1997. *Elsevier Science*, (21), pp.302–310.
Orellana, M. & Guajardo, V., 2004. *Rev. Méd. Chile*, pp.85–94.
Owens, J.W. & O'Connor, C.J., 1988. *Coordination Chemistry Reviews*, 84(C), pp.1–45.
Pavia, D.L., Lampman, G.M. & Kriz, G.S., 2001. Introduction to Spectroscopy third edition. *Thomson Learning, Inc.*, p.579.
Perutz,M. & Kendrew, J.,1962. Chemistry Prize, "for their studies of the structures of globular proteins".
Pyrzynska, K. & Pękal, A., 2013. *Analytical Methods*, 5(17), p.4288.
Reyes-Ortega, Y. et al., 1998. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (4), pp.667–674.
Reyes-Ortega, Y., 1998. *Síntesis, caracterización y actividad catalítica de compuestos modelos de peroxidasas*. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de México.
Rorabacher, D.B., 1991. *J.Anal.Chem.*, 63(2), pp.139–146.
Ruiz-Dueñas, F.J., 1998. *Caracterización molecular de un nuevo tipo de peroxidasa Ligninolítica*. Universidad Computense de Madrid.
Russell, S. & Box, P.O., 1992. *Physical Methods for Chemists,* 2da ed., Surfside.
S. F. Mason, 1958. *J. Chem. Soc.* 976.

Sánchez-Sandoval, A. et al., 2003. *Biophysical Chemistry*, 106(3), pp.253–265.
Stillman, M.J. et al., 2017. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 15(43), pp.9081–9094.
Stuart, B., 2004. *Infrared spectroscopy and applications*, John Wiley & Sons.
Tasaki, A., Otsuka, J. & Kotani, M., 1967. *Biochim.Biophys.*, 140(2), pp.284–290.
Walker, G.N.L.M. and F.A., 1979. Nuclear Magnetic Resonance of Paramagnetic Metalloporphyrins. In D. DOLPHIN, ed. *THE PORPHYRINS*. New York: ACADEMIC PRESS, pp. 61–152.
Weil, J.A.. B.J.R., 2007. *Electron Paramagnetic Resonance*,
Weiss, C., Kobayashi, H. & Gouterman, M., 1965. *Journal of Molecular Spectroscopy*, Parte III(16), pp.415–450.
Werner, W., Rey, H.G. & Wielinger, H., 1970. *Z.Anal.Chem.*, pp.224–252.
Yonetani, T., Tetsutaro, I. & Toshio, A., 1972. *The Journal of Biological Chemistry*, 247(3), pp.863–868.
Zavala, A., 2008. *Lat.Am.J.Phys.Educ.*, 2, pp.336–345.
Zerner, M., Gouterman, M. & Kobayashi, H., 1966. Porphyrins. *Theoretica Chimica Acta*, 6(5), pp.363–400.

APÉNDICE A

Tablas de datos cinéticos

Tabla 1. Comportamiento de Michaelis-Menten. Variación de [**1**] con [H_2O_2] y [Guayacol] constantes.

	[(tpe)(pp)]Fe(III)$_f$, mM								
	0.0082	**0.0075**	**0.0069**	**0.0067**	**0.0054**	**0.0049**	**0.0041**	**0.003**	**0.0028**
	0.0587	0.05	0.048	0.047	0.0373	0.0343	0.023	0.02	0.0155
	0.0596	0.053	0.0483	0.0473	0.0376	0.0346	0.025	0.02	0.0164
	0.0598	0.0536	0.0487	0.0475	0.0385	0.0347	0.0266	0.0201	0.0174
	0.0599	0.0539	0.0499	0.048	0.0387	0.0347	0.0275	0.0201	0.0179
	0.06	0.054	0.0501	0.0481	0.039	0.0348	0.029	0.0203	0.018
	0.0601	0.0542	0.0503	0.0481	0.0391	0.0348	0.0295	0.021	0.0186
	0.0602	0.0547	0.0505	0.0481	0.0392	0.0349	0.0298	0.0211	0.0194
	0.0602	0.0549	0.0506	0.0483	0.0395	0.0349	0.0298	0.0213	0.0196
	0.0605	0.0551	0.0509	0.0483	0.04	0.035	0.03	0.022	0.02
	0.0612	0.0555	0.0509	0.0484	0.0401	0.0356	0.0307	0.0221	0.0206
	---	0.0559	0.0509	0.0485	0.0406	---	0.031	0.0221	0.0206
	0.064	0.059	0.0516	0.0494	---	0.037	0.0311	0.0226	0.0206
***v*$_0$ promedio**	**0.0603**	**0.0545**	**0.0500**	**0.0481**	**0.0390**	**0.0350**	**0.0286**	**0.0211**	**0.0187**
S$_x$	**0.0155**	**0.002**	**0.0011**	**0.0006**	**0.0009**	**0.0007**	**0.0025**	**0.0009**	**0.0016**

Tabla 2. Comportamiento de Michaelis-Menten. Variación de [H_2O_2] con [**1**] y [Guayacol] constantes.

	[H_2O_2]$_f$, mM										
	14	**21**	**28**	**35**	**42**	**49**	**56**	**63**	**7**	**77**	**84**
	---	0.0146	0.0208	0.0268	0.0311	0.035	0.0403	0.0454	0.0412	0.0422	0.0503
	0.0078	0.0164	0.0228	0.027	0.0325	0.0357	0.0404	0.0455	0.0424	0.0504	0.053
	0.008	0.0178	0.023	0.0275	0.0345	0.0373	0.044	0.0465	0.0445	0.0509	0.0537
	0.0098	0.018	0.0235	0.0276	0.0347	0.0376	0.0447	0.0475	0.0484	0.0515	0.0539
	0.0099	0.018	0.0245	0.0279	0.035	0.0379	0.0448	0.0485	0.0512	0.0518	0.054
	0.0103	0.0181	0.0246	0.028	0.0361	0.038	0.0453	0.0487	0.0517	0.052	0.0542
	0.0104	0.0184	0.0268	0.0282	0.0365	0.0381	0.0455	0.049	0.0525	0.0552	0.0545
	0.0105	0.0185	0.0269	0.0286	0.037	0.0385	0.0457	0.0492	0.053	0.0555	0.0565
	0.011	0.019	0.027	0.029	0.0372	0.04	0.0459	0.0498	0.0532	0.056	0.0591
	0.0111	0.0191	0.0273	0.0292	0.0375	0.041	0.046	0.0501	0.0535	0.057	0.0595
	0.012	0.02	0.0275	0.0295	0.0376	0.042	0.0465	0.0508	0.0537	0.0621	0.0644
	0.0155	0.0246	0.0278	---	0.0376	0.0444	0.0488	0.0509	0.0569	---	---
***v*$_0$ promedio**	**0.0106**	**0.0185**	**0.0252**	**0.0281**	**0.0356**	**0.0388**	**0.0448**	**0.0485**	**0.0502**	**0.0532**	**0.0557**
S$_x$	**0.0019**	**0.0023**	**0.0022**	**0.0008**	**0.0020**	**0.0025**	**0.0023**	**0.0018**	**0.0048**	**0.0048**	**0.0037**

Tabla 3. Comportamiento de Michaelis-Menten. Variación de [Guayacol] con [H_2O_2] y [**1**] constantes.

	[Guayacol]$_f$, mM								
	0.0201	**0.0342**	**0.0482**	**0.0623**	**0.0764**	**0.0905**	**0.1045**	**0.1186**	**0.1326**
	0.015	0.0243	0.0306	0.0375	0.036	0.0405	---	0.0399	0.0396
	0.0152	0.0252	0.0306	0.0376	0.0406	0.0417	---	0.0479	0.0429
	0.0168	0.0274	0.0332	0.0395	0.0419	0.0427	0.0419	0.0497	0.0463
	0.0178	0.0291	0.0338	0.0403	0.0424	0.0436	0.0434	0.0505	0.0506
	0.0182	0.0291	0.0342	0.0405	0.0447	0.0437	0.0477	0.0507	0.0527
	0.0192	0.0298	0.0348	0.0413	0.0453	0.045	0.0483	0.0509	0.0542
	0.0196	0.0304	0.035	0.0433	0.047	0.0456	0.0497	0.051	0.0549
	0.0204	0.0308	0.0367	0.0457	0.0487	0.0467	0.0514	0.0519	0.0564
	0.021	0.0312	0.037	0.0489	0.0489	0.0483	0.053	0.0529	0.0578
	0.0212	0.0318	0.0395	0.0499	0.0493	0.0483	0.0541	0.0537	0.0598
	0.0218	0.0355	0.0402	0.0561	0.0499	0.0504	0.0563	0.0562	0.0603
	--	0.0364	0.0415	--	0.0525	0.0512	0.0583	0.0614	--
***v0* promedio**	**0.0188**	**0.0300**	**0.0356**	**0.0437**	**0.0456**	**0.0456**	**0.0504**	**0.0514**	**0.0523**
S_x	**0.0023**	**0.0034**	**0.0034**	**0.0056**	**0.0045**	**0.0033**	**0.0050**	**0.0048**	**0.0065**

Tabla 4. Velocidades iniciales con [Guayacol]f: 0.0000631 M y [1]f: 0.0082 M con [H_2O_2] variable.

	[H_2O_2]$_f$, M							
	0.007	**0.014**	**0.021**	**0.028**	**0.035**	**0.042**	**0.049**	**0.056**
	0.0084	0.0218	0.0469	0.0513	0.0711	0.082	0.0848	0.1
	0.0115	0.0226	0.0473	0.0579	0.0716	0.0862	0.0866	0.101
	0.0127	0.0296	0.0489	0.058	0.0727	0.0863	0.09	0.1025
	0.0133	0.0306	0.0493	0.0619	0.0737	0.0865	0.0902	0.1029
	0.0134	0.031	0.0485	0.0645	0.0748	0.0865	0.0959	0.103
	0.0137	0.0352	0.0478	0.0653	0.0761	0.0892	0.0961	0.1032
	0.0142	0.0356	0.0501	0.0658	0.0768	0.09	0.0998	0.1036
	0.0143	0.0394	0.053	0.0661	0.0805	0.0912	0.1019	0.1036
	0.0148	0.0405	0.0539	0.067	0.0817	0.0929	0.109	0.1109
	0.0171	0.042	0.054	0.0691	0.0865	0.0937	0.1179	---
***v0* promedio**	**0.0133**	**0.0328**	**0.0499**	**0.0626**	**0.0765**	**0.0885**	**0.0972**	**0.1050**
S_x	**0.00215**	**0.0066**	**0.0026**	**0.0052**	**0.0047**	**0.0034**	**0.0098**	**0.0029**

Tabla 5. Velocidades iniciales con [Guayacol]f: 0.00009045 M [**1**]f: 0.0082 M con [H_2O_2] variable.

	$[H_2O_2]_f$, M									
	0.0007	**0.0014**	**0.0021**	**0.0028**	**0.0035**	**0.0042**	**0.0049**	**0.0056**	**0.0063**	**0.007**
	0.0092	-	0.038	0.0639	0.0673	0.0776	0.088	0.09	0.0896	0.1043
	0.0107	-	0.0434	0.0645	0.0692	0.0796	0.096	0.0982	0.0998	0.1148
	0.0115	0.0282	0.0437	0.0647	0.0773	0.0814	0.0974	0.1099	0.1009	0.1185
	0.0118	0.0297	0.0455	0.0656	0.0781	0.0873	0.0989	0.1115	0.1065	0.1299
	0.0119	0.0313	0.049	0.0666	0.0784	0.0925	0.1035	0.1127	0.1099	0.1339
	0.0124	0.0319	0.0497	0.0672	0.0792	0.0942	0.1039	0.1128	0.112	0.1354
	0.0153	0.0319	0.051	0.0678	0.0807	0.0961	0.1045	0.1173	0.1192	0.1359
	0.016	0.0337	0.0516	0.0689	0.0826	0.0992	0.1063	0.1206	0.1199	0.1363
	0.0165	0.0356	0.0581	0.0712	0.0893	0.1029	0.1067	0.1207	0.1439	0.1371
	0.0168	0.0366	0.0613	0.075	0.0952	0.1119	-	0.1253	0.178	0.144
***v*₀ promedio**	**0.0132**	**0.0324**	**0.0491**	**0.0675**	**0.0797**	**0.0923**	**0.1006**	**0.1119**	**0.1179**	**0.1290**
Sx	**0.0026**	**0.0027**	**0.0066**	**0.0033**	**0.0078**	**0.0104**	**0.0057**	**0.0102**	**0.0244**	**0.0117**

Tabla 6. Velocidades iniciales con [Guayacol]f: 0.00007638 M [**1**]f: 0.0082 M con [H_2O_2] variable.

	$[H_2O_2]_f$, M									
	0.0007	**0.0014**	**0.0021**	**0.0028**	**0.0035**	**0.0042**	**0.0049**	**0.0056**	**0.0063**	**0.007**
	0.0025	0.0335	0.0487	0.054	0.0656	0.0841	0.1024	0.1161	0.1215	0.1278
	0.0084	0.0335	0.0543	0.0605	0.0784	0.0907	0.1039	0.1212	0.1262	0.1297
	0.0101	---	0.0575	0.0668	0.0793	0.095	0.1071	0.1219	0.1315	0.1303
	0.0111	0.0356	0.0577	0.0709	0.0811	0.0974	0.1078	0.1232	0.132	0.1317
	0.012	0.036	0.0584	0.0741	0.0841	0.0995	0.1091	0.1233	0.1423	0.135
	0.0124	0.0364	0.0595	0.075	0.0857	0.1001	0.1092	0.1277	0.1432	0.1376
	0.0145	0.0366	0.06	0.0754	0.087	0.1001	0.1096	0.1315	0.1448	0.1433
	0.0151	0.037	0.0601	0.0766	0.0877	0.1075	0.1182	0.1328	0.1536	0.1472
	0.0176	0.0382	0.0608	0.0769	0.0938	0.1077	0.1304	0.1339	0.1547	0.1486
	0.0182	0.0383	0.0628	0.0797	0.1001	---	0.1415	---	0.1582	---
***v*₀ promedio**	**0.0122**	**0.0361**	**0.0579**	**0.0709**	**0.0843**	**0.0981**	**0.1139**	**0.1257**	**0.1408**	**0.1368**
S_x	**0.0044**	**0.0016**	**0.0037**	**0.0077**	**0.0088**	**0.0071**	**0.0119**	**0.0057**	**0.0119**	**0.0074**

Tabla 7. Recíprocos

		[Guayacol], M	**0.000063**	**0.000076**	**0.000091**	**0.000063**	**0.000076**	**0.000091**
		1/[Guayacol], M	**15847.86**	**13092.43**	**11055.83**	**15847.86**	**13092.43**	**11055.83**
$[E]_f$,M	**$[H_2O_2]_f$, M**	**$1/[H_2O_2]$**	***vo*, mAbs/seg**	***vo*, mAbs/seg**	***vo*, mAbs/seg**	**[E]/*vo***	**[E]/*vo***	**[E]/*vo***
0.000082	0.007	142.857	0.800	0.793	0.731	0.000101	0.000102	0.00011
0.000082	0.014	71.428	1.969	1.942	2.167	4.14E-05	4.20E-05	3.76E-05
0.000082	0.021	47.619	2.998	2.947	3.478	2.72E-05	2.77E-05	2.34E-05
0.000082	0.028	35.714	3.761	4.052	4.259	2.17E-05	2.01E-05	1.91E-05
0.000082	0.035	28.571	4.593	4.783	5.057	1.78E-05	1.70E-05	1.61E-05
0.000082	0.042	23.809	5.307	5.536	5.881	1.54E-05	1.47E-05	1.37E-05
0.000082	0.049	20.408	5.833	6.035	6.835	1.39E-05	1.35E-05	1.19E-05
0.000082	0.056	17.857	6.304	6.714	7.544	1.29E-05	1.21E-05	1.08E-05

Tabla 8. Gráfica secundaria: Intercepto Primario vs **1**/$[Guayacol]_f$

[Guayacol], M	**Intercepto Primario, Ms**	**1/[Guayacol], M**
0.0000631	2.87105E-05	15847.86054
0.00007638	1.88E-05	13092.43257
0.00009045	1.47547E-05	11055.83195