

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Posgrado en Ciencias Químicas

Facultad de Ciencias Químicas

Centro de Química del Instituto de Ciencias (ICUAP)

Laboratorio de Química Inorgánica



**“Obtención de dos compuestos de coordinación
modelos de peroxidasa *porfirina-pinza*, con *N,N,N',N'*-
tetrakis-[*N*-((2-metilpiridin)etil)propanamida]
etilendiamina (tpe) con [(cloro) (deutero y
mesoporfirinatódimetiléster)]hierro(III), sus estudios
electrónicos, magnéticos y su actividad antioxidante”**

TESIS

Presentada para obtener el grado de Maestría en
Ciencias Químicas

PRESENTA

Q. Nailea Karina Sánchez Morales

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Yasmi Reyes Ortega

CO-DIRECTOR

Dr. Samuel Hernández Anzaldo

Octubre 2018

Comité Tutorial

Dr. Miguel Ángel Muñoz Hernández (CIQ-UAEM)

Dra. Lidia Esmeralda García Díaz (CQ-ICUAP)

Dra. Brenda Leonor Sánchez Gaytán (CQ-ICUAP)

Dra. Sandra Elizabeth Pineda Sanabria (CQ-ICUAP)



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por el Dr. Miguel Ángel Muñoz Hernández, Dra. Lidia Esmeralda García Díaz, Dra. Brenda Leonor Sánchez Gaytán y la Dra. Sandra Elizabeth Pineda, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **"Obtención de dos compuestos de coordinación modelos de peroxidasa porfirina-pinza, con N,N,N',N'-tetrakis-[N-((2-metilpiridin)etil)propanamida] etilendiamina (tpe) con [(cloro) (deutero y mesoporfirinatotodimetiléster)]hierro(III), sus estudios electrónicos, magnéticos y su actividad antioxidante"**, que presenta la alumna **Nailea Karina Sánchez Morales** para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los treinta días del mes de agosto del año dos mil dieciocho.

ATENTAMENTE

Dr. Miguel Ángel Muñoz Hernández

Dra. Lidia Esmeralda García Díaz

Dra. Brenda Leonor Sánchez Gaytán

Dra. Sandra Elizabeth Pineda

ÍNDICE

<i>Agradecimientos</i>	<i>vi</i>
<i>Dedicatorias</i>	<i>vii</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>viii</i>
<i>Resumen de Figuras</i>	<i>ix</i>
<i>Resumen de Esquemas</i>	<i>xii</i>
<i>Resumen de Tablas</i>	<i>xiii</i>
<i>Resumen Gráfico</i>	<i>xvii</i>
<i>Resumen Escrito</i>	<i>xviii</i>

1 CAPÍTULO

<i>Introducción</i>	1.1	Introducción y justificación.....	2
	1.2	Antecedentes.....	3
	1.2.1	Porfirinas.....	3
	1.2.2	Ligantes dendrímeros.....	4
	1.2.3	Dendrímeros porfirínicos y metaloporfirinas.....	5
	1.2.4	Peroxidasa de rábano blanco (HRP).....	5
	1.2.5	Cinética enzimática.....	7
	1.2.6	Métodos espectroscópicos.....	12
	1.2.6.1	Espectroscopía de UV-Vis.....	12
	1.2.6.2	Espectroscopía de IR.....	13
	1.2.6.3	Espectroscopía de RMN- ¹ H.....	14
	1.2.6.4	Espectroscopía de RPE.....	14
	1.3	Hipótesis.....	16
	1.4	Objetivo general.....	16

1.5 Objetivos específicos.....	16
--------------------------------	----

2 CAPÍTULO

<i>Metodología</i>	2.1 Equipos, materiales y métodos.....	18
<i>y</i>	2.2 Métodos de síntesis de [(tpe)(DP)]Fe(III) y	
<i>tratamiento</i>	[(tpe)(MP)]Fe(III).....	18
<i>de datos</i>	2.3 Prueba cualitativa como antioxidante.....	19
	2.4 Estudios cinéticos.....	21
	2.4.1 Comportamiento Michaelis – Menten.....	25
	2.4.2 Tratamiento estadístico.....	29

3 CAPÍTULO

<i>Resultados</i>	3.1 UV–Vis.....	32
<i>y</i>	3.2 IR.....	35
<i>su discusión</i>	3.3 RMN– ¹ H.....	36
	3.4 RPE.....	38
	3.5 Prueba cualitativa como antioxidante.....	42
	3.6 Detección de la formación del radical π -catiónico	
	ferrilo [Por-Fe(IV)=O] ⁺ por UV–Vis y RPE.....	43
	3.7 Cuantificación de K_M y de k_{cat}	45

4 CAPÍTULO

<i>Conclusiones</i>	4.1 Conclusiones.....	54
---------------------	-----------------------	----

Bibliografía	55
Apéndice I. Espectros de UV–Vis, IR, RMN- ¹ H y RPE.....	59
Apéndice I. Tablas de datos cinéticos.....	63

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Yasmi y al Dr. Samuel por apoyarme en la realización de la tesis.

Gracias Nancy por apoyarme en las mediciones cinéticas y en la parte experimental de la tesis, por ser mi amiga. Siempre te estaré muy agradecida.

Gracias Karen y Gaby por apoyarme incondicionalmente en la maestría y por ser mis amigas.

Agradezco al Dr. Daniel Ramírez Rosales y a la M. C. F. M. Stephany Natasha Arellano Ahumado del IPN por las mediciones de RPE.

Dedicatorias

“No permitas que nadie diga que eres incapaz de hacer algo. Si tienes un sueño, debes conservarlo”
Will Smith

Le dedico mi tesis a Manuel por su amor y apoyo incondicional en la maestría. Te amo mucho.

Agradezco el apoyo de mis padres Humberto Sánchez, Rosa Morales y mi hermano José Sánchez, los amo mucho.

La familia es una parte importante de mi vida, gracias por todo.

Abreviaturas

[(Cl)(DP)]Fe(III): [(cloro)(deuteroporfirinatosdimetiléster)]hierro(III)

[(Cl)(MP)]Fe(III): [(cloro)(mesoporfirinatosdimetiléster)]hierro(III)

tpe: *N,N,N',N'*-tetrakis-[*N*-((2-metilpiridin)etil)propanamida]etilendiamina

[(tpe)(DP)]Fe(III): [(tpe)(deuteroporfirinatosdimetiléster)]hierro(III)

[(tpe)(MP)]Fe(III): [(tpe)(mesoporfirinatosdimetiléster)]hierro(III)

ecm: Espín cuánticamente mezclado

POG: Productos de oxidación de guayacol

UV-Vis: Espectroscopía de ultravioleta visible

IR: Espectroscopía infrarroja

RMN-¹H: Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón

RPE: Resonancia paramagnética electrónica

\bar{X}_{v_0} : Velocidad inicial promedio

S: Desviación estándar

ca: Concentración aproximada

Resumen de Figuras

Figura 1 Estructura general de las porfirinas–pinza.

Figura 2 a, Estructura y nomenclatura general de la porfirina. **b**, [(cloro)(deuteroporfirinatosdimetiléster)]hierro(III) 1; [(cloro)(mesoporfirinatosdimetiléster)]hierro(III) 2.

Figura 3 Coordinación química de las porfirinas: la metalación de una porfirina es también la coordinación ecuatorial del metal; X y Y son ligantes axiales.

Figura 4 Representación de un dendrímero de segunda generación.

Figura 5 Ligante dendrímero tpe (*N,N,N',N'*-tetrakis-[*N*-((2-metilpiridin)etil)propanamida]etilendiamina).

Figura 6 Clasificación estructural de los dendrímeros porfirínicos. El símbolo “P” denota una unidad porfirínica.

Figura 7 a Representación tridimensional de la estructura cristalina de rayos-X de HRP y **b** acercamiento del sitio activo.

Figura 8 Desdoblamiento de los orbitales *d* para los estados bajo espín **a** ($s = 1/2$), **b** espín intermedio ($s = 3/2$), **c** mezcla cuántica de los estados $s = 5/2, 3/2$ y **d** alto espín ($s = 5/2$) del hemo-Fe³⁺ en función del ligante axial para compuestos y biomoléculas con hexacoordinación.

Figura 9 Ciclo catalítico de la HRP.

Figura 10 Relación lineal entre la ν_0 y la variación de la concentración de E.

Figura 11 Relación hiperbólica entre la ν_0 y la variación de la concentración de S.

Figura 12 Gráficas primarias.

Figura 13 Gráfica secundaria.

Figura 14 Espectro isotrópico.

Figura 15 Espectros axiales.

Figura 16 Espectro rómbico.

Figura 17 Seguimiento de la reacción de $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ con DPPH por UV-Vis. Espectros obtenidos en un intervalo de 0–8 horas.

Figura 18 Seguimiento de la reacción de $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ con DPPH por UV-Vis. Espectros obtenidos en un intervalo de 0–8 horas.

Figura 19 Seguimiento por UV-Vis de la reacción de guayacol con H_2O_2 . Espectros obtenidos en un intervalo de 0–7 horas.

Figura 20 Seguimiento por UV-Vis de la reacción de $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ con guayacol. Espectros obtenidos en un intervalo de 0–7 horas.

Figura 21 Seguimiento por UV-Vis de la reacción de $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ con guayacol. Espectros obtenidos en un intervalo de 0–7 horas.

Figura 22 Seguimiento de la reacción de $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ con H_2O_2 por UV-Vis. Espectros obtenidos en un intervalo de 0–20 horas.

Figura 23 Seguimiento de la reacción de $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ con H_2O_2 por UV-Vis. Espectros obtenidos en un intervalo de 0–20 horas.

Figura 24 Seguimiento por UV-Vis de la formación de los POG de $[(tpe)(DP)]Fe(III)$. Espectros obtenidos en un intervalo de 0–5 horas.

Figura 25 Seguimiento por UV-Vis de la formación de los POG de $[(tpe)(MP)]Fe(III)$. Espectros obtenidos en un intervalo de 0–5 horas.

Figura 26 Comportamiento típico Michaelis – Menten cuando se varió la concentración de $[(tpe)(DP)]Fe(III)$.

Figura 27 Comportamiento típico Michaelis – Menten cuando se varió la concentración de $[(tpe)(MP)]Fe(III)$.

Figura 28 Comportamiento típico Michaelis – Menten de $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ cuando se varió la concentración de H_2O_2 .

Gráfica 29 Comportamiento típico Michaelis – Menten de $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ cuando se varió la concentración de H_2O_2 .

Figura 30 Comportamiento típico Michaelis – Menten de $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ cuando se varió la concentración de Guayacol.

Figura 31 Comportamiento típico Michaelis – Menten de $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ cuando se varió la concentración de Guayacol.

Figura 32 Espectro de UV–Vis de DPDME (Deuteroporfirinadimetiléster).

Figura 33 Espectro de UV–Vis de DPDMEFe(III).

Figura 34 Espectros de UV–Vis de los compuestos [(Cl)(DP)]Fe(III) – [(tpe)(DP)]Fe(III).

Figura 35 Comparación de los espectros de UV–Vis de los compuestos [(Cl)(MP)]Fe(III) – [(tpe)(MP)]Fe(III).

Figura 36 Espectros de IR (cm^{-1}) de los compuestos [DP]Fe(III) – [(tpe)(DP)]Fe(III), [MP]Fe(III) – [(tpe)(MP)]Fe(III) y el ligante libre.

Figura 37 Espectros de RMN– ^1H de los compuestos [(Cl)(DP)]Fe(III) – [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(Cl)(MP)]Fe(III) – [(tpe)(MP)]Fe(III).

Figura 38 Espectros de RPE de los compuestos [(Cl)(DP)]Fe(III) - [(tpe)(DP)]Fe(III).

Figura 39 Espectros de RPE de los compuestos [(Cl)(MP)]Fe(III) - [(tpe)(MP)]Fe(III).

Figura 40 Gráficas de Maltempo y Moss.

Figura 41 Porcentajes de espín de los compuestos [(Cl)(DP)]Fe(III) - [(tpe)(DP)]Fe(III).

Figura 42 Porcentajes de espín de los compuestos [(Cl)(MP)]Fe(III) - [(tpe)(MP)]Fe(III).

Figura 43 Espectro axial de RPE de $\{[(tpe)(DP)]\text{Fe(IV)=O}\}^+$.

Figura 44 Espectro axial de RPE de $\{[(tpe)(MP)]\text{Fe(IV)=O}\}^+$.

Figura 45 Gráfica primaria para el compuesto [(tpe)(DP)]Fe(III).

Figura 46 Gráfica primaria para el compuesto [(tpe)(MP)]Fe(III).

Figura 47 Gráfica secundaria para el compuesto [(tpe)(DP)]Fe(III).

Figura 48 Gráfica secundaria para el compuesto [(tpe)(MP)]Fe(III).

Resumen de Esquemas

Esquema 1 Primer paso de la reacción general de Michaelis–Menten.

Esquema 2 Segundo paso de la reacción general de Michaelis–Menten.

Esquema 3 Reacción general para la obtención del compuesto [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III).

Esquema 4 Reacción general de [(tpe)(DP)]Fe(III) con DPPH.

Esquema 5 Reacción general de [(tpe)(DP)]Fe(III) con H₂O₂.

Esquema 6 Paso limitante de la velocidad de reacción.

Esquema 7 Mecanismo propuesto para la formación del Compuesto I.

Esquema 8 Mecanismo propuesto para la reducción del Compuesto II a [(picdien)(DP)]Fe(III) y [(picdien)(MP)]Fe(III).

Resumen de Tablas

Tabla 1

Resultados de las pruebas de combinación de reactivos de [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III).

Tabla 2

Intervalos de concentraciones utilizados para determinar los parámetros cinéticos del comportamiento Michaelis-Menten.

Tabla 3

Comportamiento Michaelis – Menten. Velocidades iniciales de variación de [(tpe)(DP)]Fe(III) con [H₂O₂] y [Guayacol] constantes.

Tabla 4

Comportamiento Michaelis – Menten. Variación de [(tpe)(DP)]Fe(III) con [H₂O₂] y [Guayacol] constantes.

Tabla 5

Comportamiento Michaelis – Menten. Velocidades iniciales de variación de [H₂O₂] con [(tpe)(DP)]Fe(III) y [Guayacol] constantes.

Tabla 6

Comportamiento Michaelis – Menten. Variación de [H₂O₂] con [(tpe)(DP)]Fe(III) y [Guayacol] constantes.

Tabla 7

Comportamiento Michaelis – Menten. Velocidades iniciales de variación de [Guayacol] con [H₂O₂] y [(tpe)(DP)]Fe(III) y constantes.

Tabla 8

Comportamiento Michaelis – Menten. Variación de [Guayacol] con [(tpe)(DP)]Fe(III) y [H₂O₂] y constantes.

Tabla 9

Comportamiento ping-pong. Variación de [H₂O₂] con [(tpe)(DP)]Fe(III) y [0.00007 Guayacol] constantes.

Tabla 10

Comportamiento ping-pong. Variación de [H₂O₂] con [(tpe)(DP)]Fe(III) y [0.00008 Guayacol] constantes.

Tabla 11

Comportamiento ping-pong. Variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ y $[0.00009 \text{ Guayacol}]$ constantes.

Tabla 12

Comportamiento ping-pong. Gráfica primaria: variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ y $[0.00007 \text{ Guayacol}]$ constantes.

Tabla 13

Comportamiento ping-pong. Gráfica primaria: variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ y $[0.00008 \text{ Guayacol}]$ constantes.

Tabla 14

Comportamiento ping-pong. Gráfica primaria: variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ y $[0.00009 \text{ Guayacol}]$ constantes.

Tabla 15

Comportamiento ping-pong. Gráfica secundaria: intercepto primario vs $1/[Guayacol]$.

Tabla 16

Comportamiento Michaelis – Menten. Velocidades iniciales de variación de $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ con $[H_2O_2]$ y $[Guayacol]$ constantes.

Tabla 17

Comportamiento Michaelis – Menten. Variación de $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ con $[H_2O_2]$ y $[Guayacol]$ constantes.

Tabla 18

Comportamiento Michaelis – Menten. Velocidades iniciales de variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ y $[Guayacol]$ constantes.

Tabla 19

Comportamiento Michaelis – Menten. Variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ y $[Guayacol]$ constantes.

Tabla 20

Comportamiento Michaelis – Menten. Velocidades iniciales de variación de $[Guayacol]$ con $[H_2O_2]$ y $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ y constantes.

Tabla 21

Comportamiento Michaelis – Menten. Variación de $[Guayacol]$ con $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ y $[H_2O_2]$ y constantes.

Tabla 22

Comportamiento ping-pong. Variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ y $[0.00005$ Guayacol] constantes.

Tabla 23

Comportamiento ping-pong. Variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ y $[0.00006$ Guayacol] constantes.

Tabla 24

Comportamiento ping-pong. Variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ y $[0.00007$ Guayacol] constantes.

Tabla 25

Comportamiento ping-pong. Gráfica primaria: variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ y $[0.00005$ Guayacol] constantes.

Tabla 26

Comportamiento ping-pong. Gráfica primaria: variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ y $[0.00006$ Guayacol] constantes.

Tabla 27

Comportamiento ping-pong. Gráfica primaria: variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ y $[0.00007$ Guayacol] constantes.

Tabla 28

Comportamiento ping-pong. Gráfica secundaria: intercepto primario vs $1/[Guayacol]$.

Tabla 29

Posición de las bandas que presentan los espectros de UV-Vis de los compuestos $[(Cl)(DP)]Fe(III) - [(tpe)(DP)]Fe(III)$ y $[(Cl)(MP)]Fe(III) - [(tpe)(MP)]Fe(III)$.

Tabla 30

Posición de las bandas vibracionales que presentan los espectros de IR de los compuestos $tpe, (Cl)(DP)]Fe(III) - [(tpe)(DP)]Fe(III)$ y $[(Cl)(MP)]Fe(III) - [(tpe)(MP)]Fe(III)$.

Tabla 31

Posición de los desplazamientos químicos que presentan los espectros de RMN- 1H de los compuestos $(Cl)(DP)]Fe(III) - [(tpe)(DP)]Fe(III)$ y $[(Cl)(MP)]Fe(III) - [(tpe)(MP)]Fe(III)$.

Tabla 32

Porcentaje de especie A y B calculados a partir de los espectros de RPE de los compuestos $[(Cl)(DP)]Fe(III) - [(tpe)(DP)]Fe(III)$ y $[(Cl)(MP)]Fe(III) - [(tpe)(MP)]Fe(III)$.

Tabla 33

Valores de g y porcentaje de especie A y B calculados a partir de los espectros de RPE de los compuestos [(Cl)(DP)]Fe(III) – [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(Cl)(MP)]Fe(III) – [(tpe)(MP)]Fe(III).

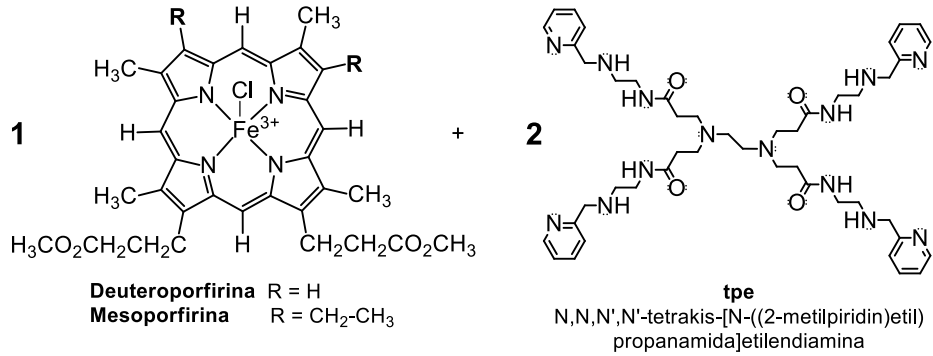
Tabla 34

Constantes de Michaelis – Menten y velocidad máxima teórica de los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III).

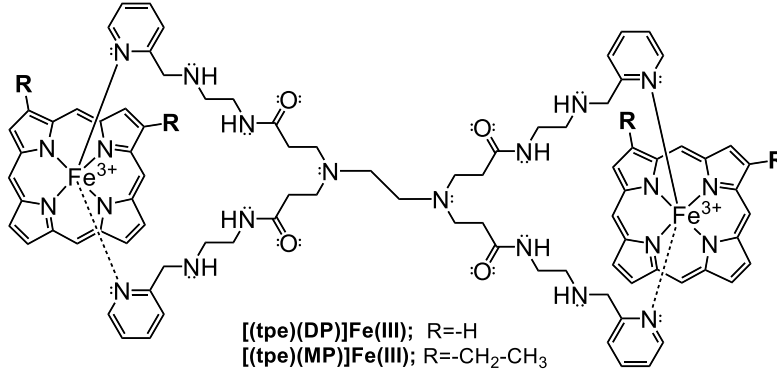
Tabla 35

Constantes de Michaelis – Menten y velocidad máxima teórica de diferentes compuestos.

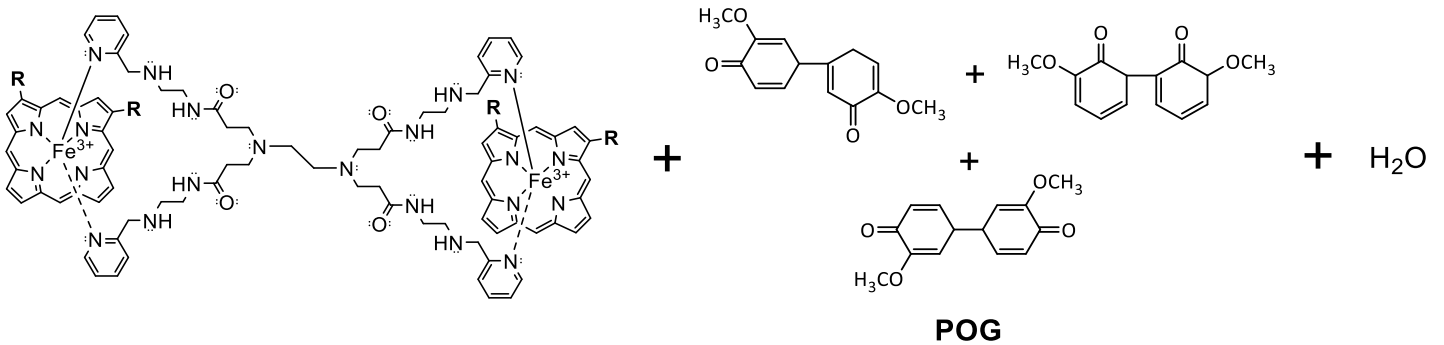
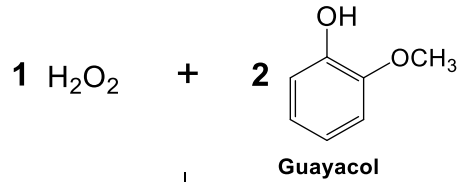
Resumen Gráfico



CH₃OH
 T = 25°C
 7 horas
 Agitación constante

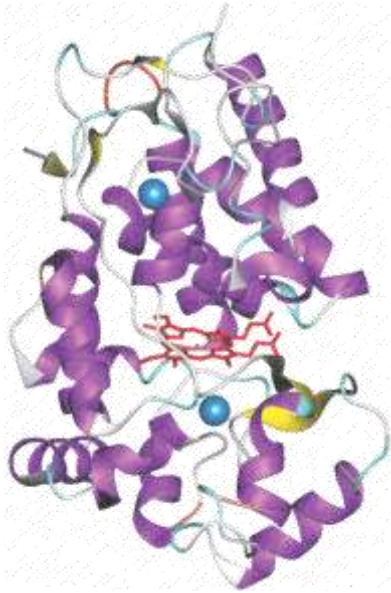


+



Resumen Escrito

Los estudios cinéticos y espectroscópicos aplicados a complejos hierro-hemo que son modelos de enzima peroxidasa, permiten conocer y entender los mecanismos de reacción del ciclo catalítico de las peroxidasas. En este trabajo se reportan los estudios espectroscópicos, como antioxidante y actividad peroxidasa de dos nuevos compuestos modelo “porfirina — pinza — peroxidasa” [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III). Se comprobó que estos compuestos presentan un comportamiento de Michaelis – Menten de enzima y una cinética típica de peroxidasa utilizando una de las reacciones exclusivas de las enzimas peroxidasa $\text{guayacol} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{peroxidasa}} \text{POG} + \text{H}_2\text{O}$. Los valores de las constantes de Michaelis–Menten (K_m) y la constante catalítica (k_{cat}) fueron para [(tpe)(DP)]Fe(III): $K_{\text{H}_2\text{O}_2} = 4.44 \times 10^{-2} \text{ M}$, $K_{\text{Guayacol}} = 6.67 \times 10^{-4} \text{ M}$, $k_{cat} = 3.333 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y para [(tpe)(MP)]Fe(III): $K_{\text{H}_2\text{O}_2} = 2.75 \times 10^{-2} \text{ M}$, $K_{\text{Guayacol}} = 3.48 \times 10^{-4} \text{ M}$, $k_{cat} = 4.43 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Las constantes de Michaelis respecto al H_2O_2 y al guayacol son muy cercanas a las mostradas por las peroxidasas nativas, y nos informan que el sitio activo de la peroxidasa y de los compuestos modelo de peroxidasas que aquí se reportan tienen afinidades semejantes por esos dos sustratos. Las constantes de velocidad son menores a las reportadas para las peroxidasas naturales que tienen $k_{cat} \geq 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Por otra parte, los espectros de RPE nos permitieron calcular los porcentajes de especies de Fe(III) con ecm, $s = 5/2$, $s = 3/2$, y cuantificar en cada una de estas el porcentaje de $s = 5/2$, $s = 3/2$ en cada especie. Esto es importante para correlacionar la presencia de especies de Fe(III) con ecm y los porcentajes de $3/2$ sobre $5/2$ en ellas, con la actividad catalítica. Los resultados de RPE fueron que los dos nuevos modelos “porfirina — pinza” tienen un mayor porcentaje de espín $5/2$, en el ecm $s = 3/2$, $s = 5/2$, el cual no favoreció una mayor actividad catalítica en comparación con los compuestos porfirina–pinza análogos reportados por Reyes–Ortega.



CAPÍTULO 1

Introducción

1.1 Introducción y justificación

1.2 Antecedentes

1.2.1 Porfirinas

1.2.2 Ligantes dendrímeros

1.2.3 Dendrímeros porfirínicos y metaloporfirinas

1.2.4 Peroxidasa de rábano blanco (HRP)

1.2.5 Cinética enzimática

1.2.6 Métodos espectroscópicos

1.2.6.1 Espectroscopía de UV-Vis

1.2.6.2 Espectroscopía de IR

1.2.6.3 Espectroscopía de RMN-¹H

1.2.6.4 Espectroscopía de RPE

1.3 Hipótesis

1.4 Objetivo general

1.5 Objetivos específicos

1.1 Introducción y justificación

La vida depende de la existencia de biocatalizadores eficientes y específicos: las enzimas. Prácticamente todas las reacciones bioquímicas son catalizadas por una enzima [Nelson & Cox, 2009]. Las peroxidasas son enzimas que contienen al grupo hemo (Figura 1) en su estructura molecular, las cuales utilizan al peróxido de hidrógeno para oxidar una amplia variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos. La peroxidasa de rábano blanco (HRP) es una enzima importante que ha sido estudiada por más de un siglo. La HRP es una hemoproteína que incluyen en su sitio activo un anillo de protoporfirina – IX coordinada a un Fe(III) [Veitch, 2004]. Diversos grupos de investigación han sintetizado modelos que sean estructural, espectroscópica, electrónica, magnética y cinéticamente equivalentes al grupo prostético del sitio activo de las peroxidasas, tal es el caso de los compuestos modelos llamados porfirina – pinza propuestos por Reyes – Ortega en 1988. Estos modelos reciben este nombre debido a que se ha propuesto que ligantes poliméricos de cadena abierta y funcionalizados en las terminales como en el picdien (1,9-bis(2-piridil)-2,5,8-triazanonano) coordinándose axialmente al ion Fe(III) del grupo hemo, se fijan de modo similar a como lo haría una pinza [Reyes–Ortega *et al*, 1998] (Figura 1).

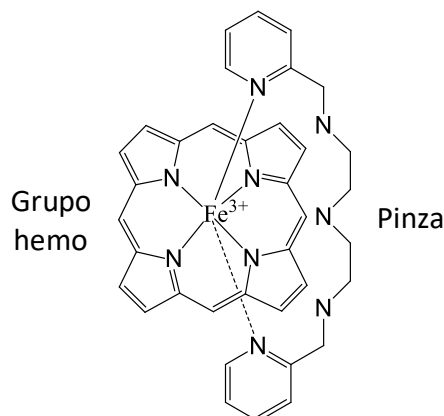


Figura 1 Estructura general de las porfirinas–pinza.

Otros compuestos dendrímicos pueden coordinarse axialmente a un anillo de porfirina. El desarrollo de dendrímicos porfirínicos ha sido inspirado y promovido por muchas funciones interesantes de derivados porfirínicos en sistemas biológicos [Wei–Shi & Takuzo, 2009].

En este trabajo se establecieron las condiciones de reacción para la obtención de los compuestos de coordinación con el dendrímico tpe (*N,N,N',N'*-tetrakis-[*N*-((2-metilpiridin)etil)propanamida]etilendiamina) [Cervantes–Mejía *et al*, 2014] y las respectivas porfirinas [(cloro)(deuteroporfirinatodimetiléster)]hierro(III) DPFe(III); [(cloro)(mesoporfirinatodimetiléster)]hierro(III) MPFe(III); los compuestos obtenidos se caracterizaron a través de estudios espectroscópicos de UV–Vis, IR, RMN–¹H y RPE para realizar pruebas cualitativas como antioxidante y cuantificar su actividad catalítica como peroxidasa.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Porfirinas

Las porfirinas son compuestos vitales para cada célula de casi cada organismo viviente y están contenidas en las hemoproteínas. Estas últimas constan en su sitio activo de un anillo quelato de porfirina con un ion de $\text{Fe}^{(n)}$. El anillo de porfirina consta de un sistema macrocíclico tetrapirrólico con dobles enlaces conjugados y diversos grupos unidos a su alrededor (Figura 2) [Huheey *et al*, 2007].

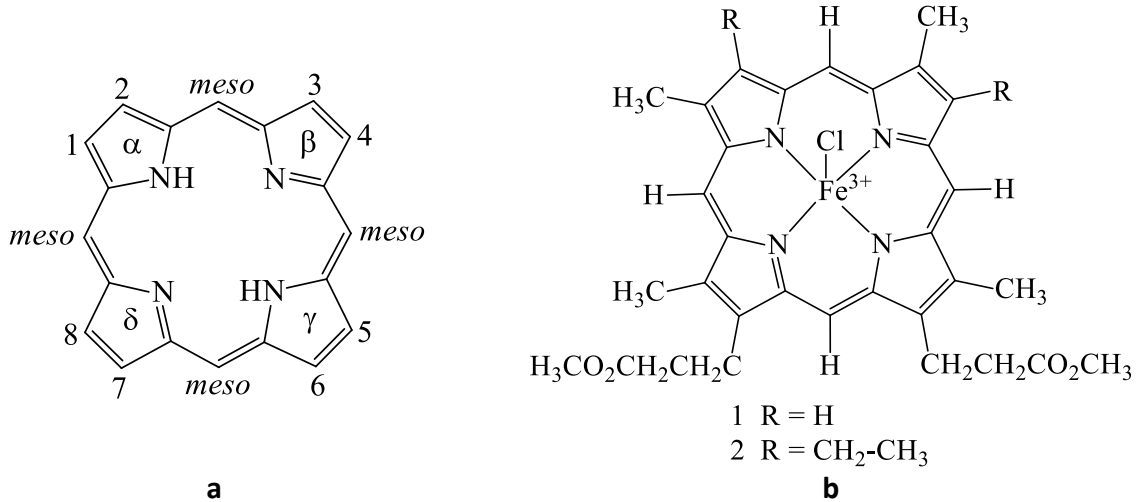


Figura 2 a, Estructura y nomenclatura general de la porfirina. **b**, [(cloro)(deuteroporfirinodimetiléster)]hierro(III) 1; [(cloro)(mesoporfirinodimetiléster)]hierro(III) 2.

Los metales de transición pueden formar compuestos de coordinación ecuatoriales con las porfirinas, y muchos de estos compuestos metaloporfirínicos son capaces de recibir ligandos de forma axial (Figura 3) [Kadish *et al*, 2000].

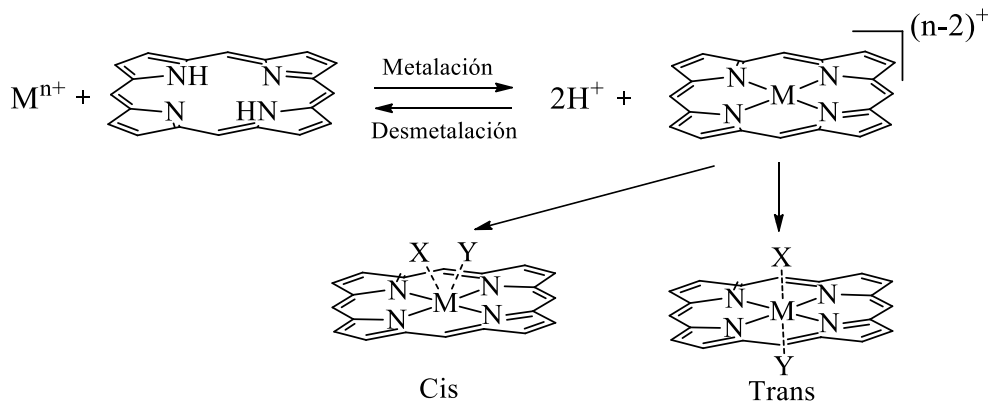


Figura 3 Coordinación química de las porfirinas: la metalación de una porfirina es también la coordinación ecuatorial del metal; X y Y son ligandos axiales.

La coordinación en la posición axial es fundamental en muchos aspectos de la bioquímica y química catalítica, pero también presenta un gran interés por sí misma [Kadish *et al*, 2000].

1.2.2 Ligantes dendrímeros

Los dendrímeros son una clase de macromoléculas ramificadas que constan principalmente de núcleo, ramas y grupos terminales (Figura 4) [Klajnert & Bryszewska, 2001].

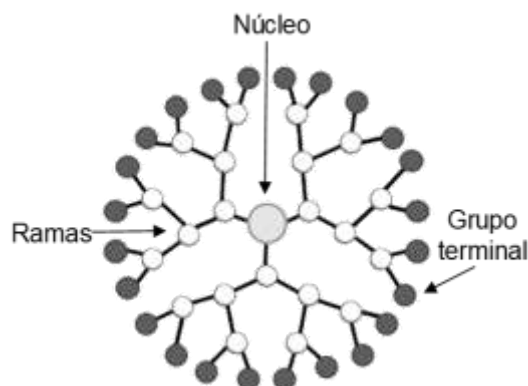


Figura 4 Representación de un dendrímero de segunda generación [Grayson & Fréchet, 2001].

La arquitectura tridimensional de los dendrímeros y las similitudes morfológicas con las proteínas pueden actuar como un atractivo escalafón para la colocación de los sitios específicos de porfirinas funcionales en los regímenes de tamaño en nanoescala [Wei-Shi & Takuzo, 2009]. Por lo tanto, por su naturaleza ramificada los dendrímeros han sido utilizados exitosamente en química de coordinación como ligantes, por ejemplo, el ligante dendrímerotpe (Figura 5) [Cervantes-Mejía *et al*, 2014], para la síntesis de compuestos de esta naturaleza [Sánchez-Sandoval *et al*, 2003; Knecht *et al*, 2008]

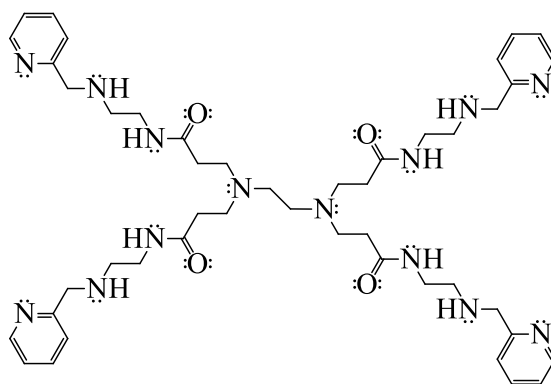


Figura 5 Ligante dendrímero tpe (*N,N,N',N'*-tetrakis-[*N*-((2-metilpiridin)etil)propanamida]etilendiamina).

La estructura de estos compuestos tiene un gran impacto en sus propiedades químicas y físicas, por lo que han sido utilizadas como plantillas para la fabricación controlada de partículas metálicas de tamaño nano usadas en catálisis [De Jesus & Flores, 2008], medicina [Patil *et al*, 2009] y para dispositivos electrónicos con funciones específicas que aprovechan las propiedades de éstas para el almacenamiento de energía y la emisión de luz [Kwon *et al*, 2004].

1.2.3 Dendrímeros porfirínicos y metaloporfirinas

La naturaleza ramificada de los dendrímeros es una propiedad estructural muy útil, ya que, al contener múltiples átomos donadores de densidad electrónica, han sido utilizados para la síntesis de dendrímeros porfirínicos [Wei-Shi & Takuzo, 2009].

Las características únicas de la síntesis iterativa paso a paso de dendrímeros, permiten funcionalizar a la porfirina o ftalocianina para ser colocada precisamente en la estructura tridimensional nanoscópica de un dendrímero porfirínico, como se ilustra en la Figura 6 [Wei-Shi & Takuzo, 2009].

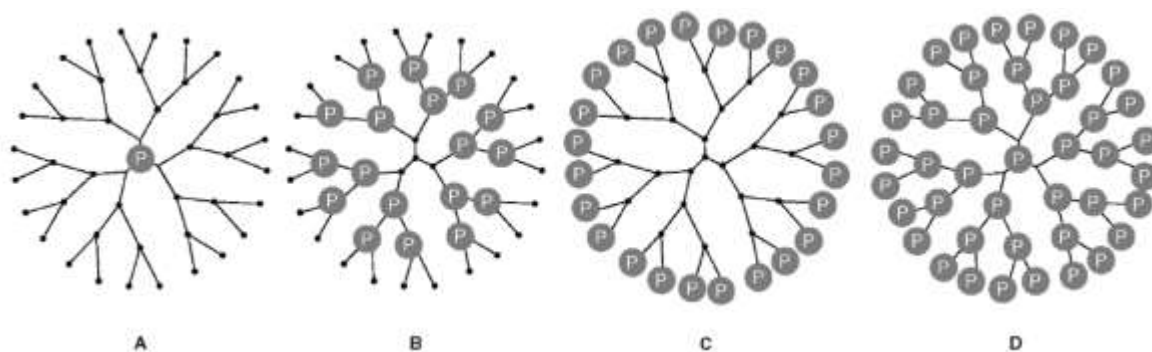


Figura 6 Clasificación estructural de los dendrímeros porfirínicos. El símbolo “P” denota una unidad porfirínica.

1.2.4 Peroxidasa de rábano blanco (HRP)

Las peroxidasas son hemoproteínas que, en presencia de un peróxido (incluyendo el H_2O_2), pueden catalizar la oxidación de un sustrato [Boelsterli, 2013]. La HRP está formada por 308 residuos de aminoácidos, dos iones Ca^{2+} y en su sitio activo tiene al grupo prostético hemo unido a través de la quinta posición axial del Fe^{3+} a la His (histidina) 170 proximal (Figura 7) [Veitch, 2004, Dunford, 1991].

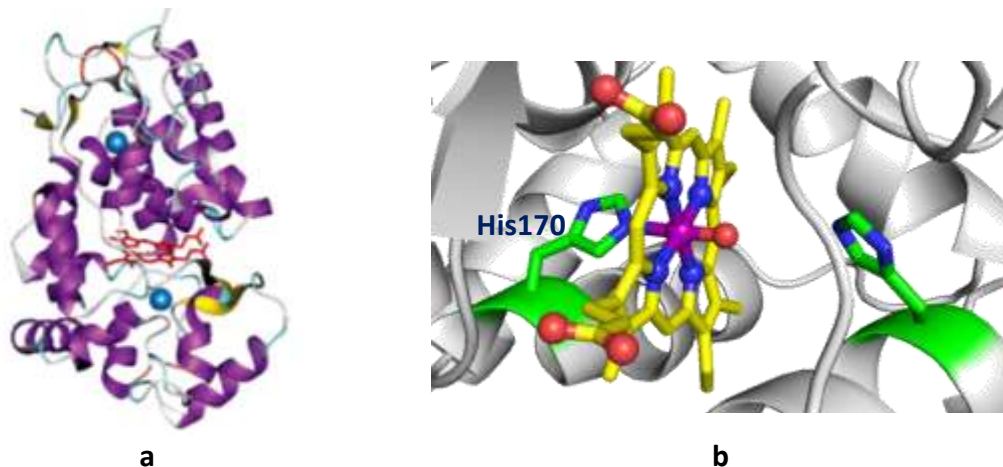


Figura 7 a Representación tridimensional de la estructura cristalina de rayos-X de HRP y b acercamiento del sitio activo [Veitch, 2004, Berglund, 2002].

El Fe^{3+} con cinco electrones en el último subnivel, $3d^5$, puede existir con cinco estados de espín diferentes: sexteto puro, 6A_1 (alto espín, $s = 5/2$); doblete puro, 2T_2 (bajo espín, $s = 1/2$); cuarteto puro, 4T_1 (espín intermedio, $s = 3/2$); mezcla térmica de los estados $s = 5/2$, $1/2$, y mezcla cuántica de los estados $s = 5/2, 3/2$ (Figura 8) [Owens & O'Connor, 1988].

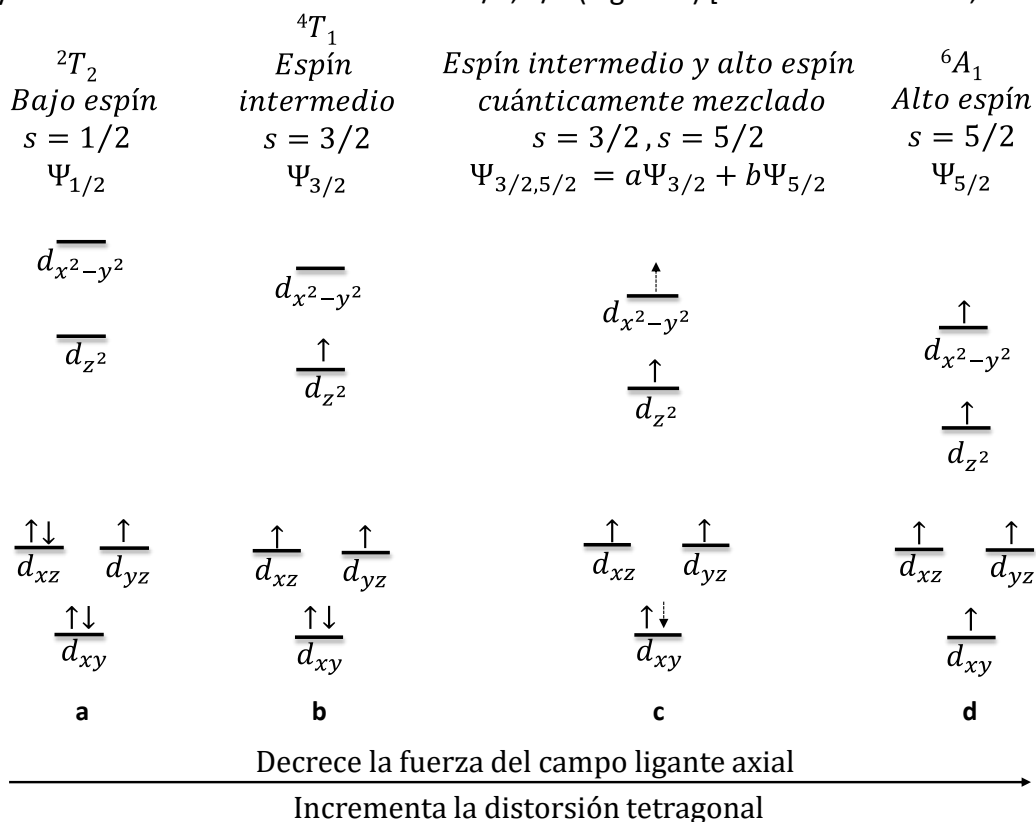


Figura 8 Desdoblamiento de los orbitales d para los estados bajo espín **a** ($s = 1/2$), **b** espín intermedio ($s = 3/2$), **c** mezcla cuántica de los estados $s = 5/2, 3/2$ y **d** alto espín ($s = 5/2$) del hemo- Fe^{3+} en función del ligante axial para compuestos y biomoléculas con hexacoordinación.

Una mezcla cuántica de estados de espín se refiere a un sistema con una función de onda que corresponde a la configuración electrónica del Fe^{3+} que contienen contribuciones de dos estados cuánticos magnéticos del Fe(III) . Al mismo tiempo cada uno de los estados cuánticos tiene una función de onda $\Psi_{3/2, 5/2}$. La función de onda $\Psi_{3/2, 5/2} = a\Psi_{3/2} + b\Psi_{5/2}$, donde a y b son los coeficientes de porcentaje de cada espín, respectivamente. El Fe^{3+} , contenido en la HRP, presenta un estado de espín cuánticamente mezclado de $s = 3/2, 5/2$. [Maltempo & Moss, 1976].

La HRP sigue el mecanismo de reacción que se describe en la Figura 9.

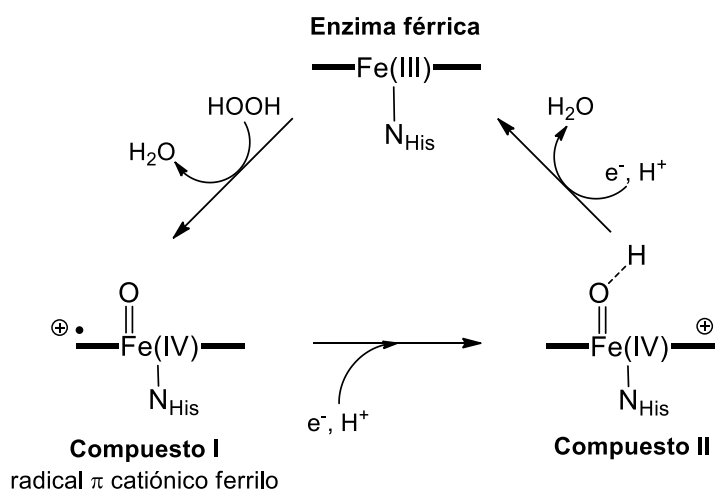


Figura 9 Ciclo catalítico de la HRP.

La enzima reacciona con un equivalente de H_2O_2 dando como producto al Compuesto I. Esta es una reacción de óxido – reducción de dos electrones en la que el H_2O_2 es reducido a H_2O y la enzima es oxidada. Un equivalente de oxidante reside en el Fe^{4+} y el otro reside en la porfirina en forma de radical π catiónico ferrilo $[\text{PorFe}^{4+}=\text{O}]^+$. A continuación, el Compuesto I puede oxidar un equivalente de sustrato mediante una reacción de transferencia electrónica en la que se forma el radical del sustrato correspondiente ($\cdot\text{A}$) quedándose con un $\cdot\text{H}$. La enzima se transforma en el Compuesto II debido a que ha recuperado su electrón ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$). Finalmente, el $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ del Compuesto II es reducido a Fe^{3+} de la enzima nativa mediante la sustracción de un electrón de otra molécula de sustrato [Berglund *et al*, 2002; Dawson, 1988].

1.2.5 Cinética enzimática

Las enzimas son catalizadores biológicos debido a que disminuyen la energía de activación de una reacción para aumentar las velocidades de las reacciones bioquímicas y, además, son altamente específicas [Chang, 2008; Nelson & Cox, 2009]. Generalmente, una reacción catalizada enzimáticamente tiene lugar en el sitio activo de la enzima. La molécula fijada en el sitio activo y sobre la que actúa la enzima se denomina sustrato. La superficie del sitio activo de la enzima está revestida con residuos de aminoácidos con grupos

sustituyentes que se unen al sustrato y catalizan su transformación química [Nelson & Cox, 2009]. La catálisis enzimática es homogénea porque el sustrato y la enzima están presentes en disolución acuosa [Chang, 2008]. También es cierto que para los catalizadores biológicos no hay esa generalización de que no intervienen en la reacción. En el caso de las peroxididasas, es la enzima la que se oxida y ella oxida al sustrato para volver a su estado nativo a través de su reducción, habiendo una reacción de oxidación reversible.

Aunque el mecanismo de reacción detallado es único para cada enzima, algunas enzimas funcionan del mismo modo general, descrito por Michaelis–Menten. Los primeros conocimientos sobre el comportamiento enzimático se deben a V. Henri, L. Michaelis y Maud L. Menten. En el trabajo experimental de Michaelis-Menten se recopilaban datos sobre los cambios en la velocidad inicial, v_0 , observándose dos tipos de comportamientos [Bohinski, 1987]:

- Cuando la concentración de sustrato [S] se mantuvo constante mientras se hacía variar la concentración de enzima [E] se observó un incremento lineal en la velocidad inicial v_0 al aumentar la [E] (Figura 10) [Bohinski, 1987]:

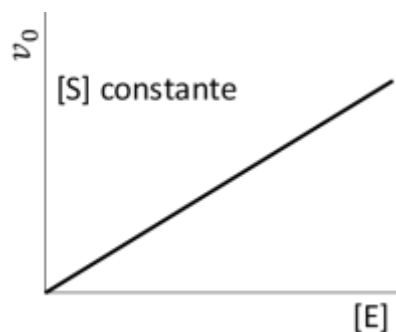


Figura 10 Relación lineal entre la v_0 y la variación de la concentración de E.

- Cuando [E] se mantuvo constante mientras se hacía variar la [S], se observó un comportamiento hiperbólico entre la v_0 y la [S]. En la gráfica hiperbólica se observó al inicio una cinética de primer orden y al incrementar la [S] se observó una cinética de orden cero alcanzándose un valor máximo de velocidad, V_{max} , (Figura 11) [Bohinski, 1987]:

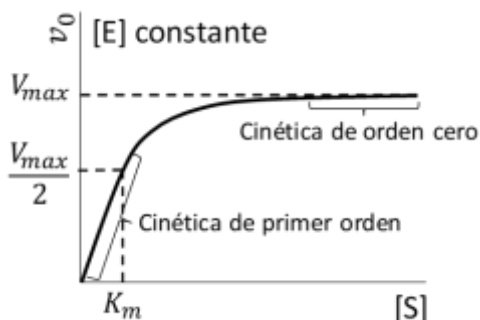
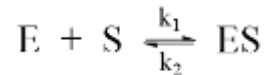


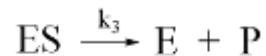
Figura 11 Relación hiperbólica entre la v_0 y la variación de la concentración de S.

Para explicar este comportamiento, Michaelis-Menten postularon que la enzima E se combina en primer lugar con su sustrato S formando el complejo enzima–sustrato ES en un paso reversible y rápido (Esquema 1) [Bohinski, 1987; Nelson & Cox, 2009]:



Esquema 1 Primer paso de la reacción general de Michaelis–Menten.

El complejo ES se descompone en un segundo paso más lento, paso limitante, que puede descomponerse dando P (producto) y E libre (Esquema 2). En los primeros momentos de la reacción, la concentración del producto, [P], es despreciable y puede ignorarse la reacción inversa $P \rightarrow S$ [Bohinski, 1987; Nelson & Cox, 2009]:



Esquema 2 Segundo paso de la reacción general de Michaelis–Menten.

En la Ecuación 1 y 2 se pueden identificar las constantes de velocidad k_1 , k_2 y k_3 . El término compuesto por las constantes de velocidad puede definirse como la constante de Michaelis-Menten:

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

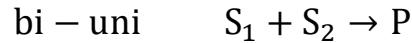
La constante K_m puede utilizarse como un indicador de la afinidad de la enzima por un sustrato; así, un valor pequeño de K_m indica una gran afinidad del catalizador por un sustrato. La concentración de sustrato a la que la velocidad de la reacción es la mitad de V_{max} es la constante de Michaelis, K_m , (Figura 11) que es característica para cada enzima que actúa sobre un sustrato determinado. La ecuación de Michaelis-Menten

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

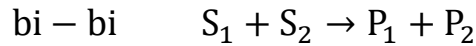
relaciona la v_0 con [S] y V_{max} a través de la constante K_m . La cinética de Michaelis-Menten se denomina también cinética del estado estacionario [Bohinski, 1987; Nelson & Cox, 2009].

La K_m y V_{max} tienen significados diferentes para diferentes enzimas. La velocidad límite de una reacción catalizada por una enzima en condiciones de saturación se describe mediante la constante de velocidad máxima teórica k_{cat} . La relación k_{cat}/K_m proporciona una buena medida de la eficiencia catalítica. La ecuación de Michaelis-Menten también es aplicable a reacciones bisustratos que tienen lugar a través de la formación de complejos ternarios o mediante mecanismos ping-pong [Nelson & Cox, 2009].

Las reacciones enzimáticas en las que hay dos sustratos (procesos bimoleculares) implican normalmente la transferencia de un átomo o un grupo funcional de un sustrato al otro [Nelson & Cox, 2009]. El proceso bimolecular global puede tener resultados diferentes, como cuando dos sustratos (S) forman un producto (P):

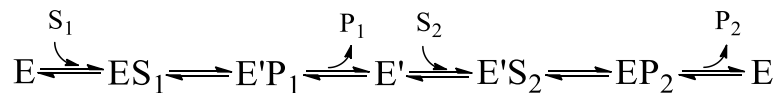


o cuando dos sustratos forman dos productos:



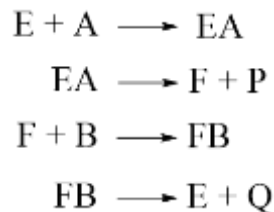
En el caso de las reacciones bi-bi hay tres posibles vías de reacción:

- *Secuencial aleatoria*. La fijación de los sustratos y la liberación de los productos no tienen un orden.
- *Secuencial ordenada*. La fijación de los sustratos y la liberación de los productos tienen un orden específico.
- *Ordenada de tipo ping-pong*. S_1 y S_2 deben fijarse en un orden específico y los productos también se forman en cierto orden, aunque para la formación del producto no se requiere que S_1 y S_2 estén fijos al mismo tiempo en el sitio activo [Bohinski, 1987].



Las peroxidasas pueden presentar una reacción del tipo ping-pong.

El esquema del mecanismo ping-pong convencional es:



donde E es la enzima en reposo, F es la enzima modificada covalentemente, A y B son los sustratos, P y Q los productos, EA y FB son los complejos enzima sustrato A y enzima modificada sustrato B [Dunford, 1991].

A partir del esquema de ping-pong peroxidasa se obtiene la ecuación para ajustar los datos experimentales de v_0 y obtener los valores de las constantes:

$$\frac{[E]_0}{v_0} = \frac{K_A}{k_{cat}} \frac{1}{[A]} + \frac{1}{k_{cat}} \left(1 + \frac{K_B}{[B]} \right) \quad \text{(Ecuación 3)}$$

donde $[E]_0$ es la concentración total de enzima, $[A]$ es la concentración de peróxido de hidrogeno, $[B]$ es la concentración de guayacol, v_0 es la velocidad inicial, K_A y K_B son las constantes de Michaelis respecto al peróxido de hidrogeno y guayacol, y k_{cat} es la constante de velocidad máxima teórica. Si $[B]$ se mantiene constante, entonces una gráfica de $[E]_0/v_0$ contra $1/[A]$ es una línea recta y para un nuevo valor de $[B]$ es obtenida una línea recta paralela. Así, la cinética de ping-pong es conocida como cinéticas de líneas paralelas. Las gráficas obtenidas usando la Ecuación 3 son llamadas Gráficas primarias (Figura 12) [Dunford, 1991].

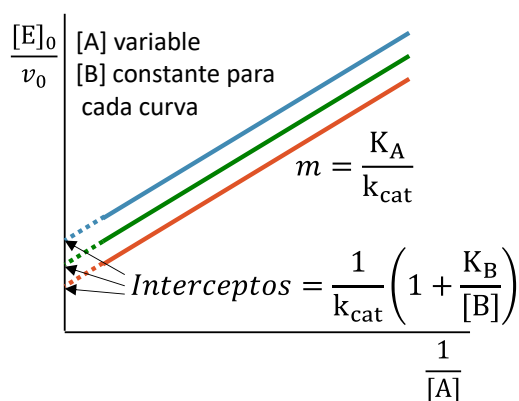


Figura 12 Gráficas primarias.

La intersección al eje y de las líneas rectas paralelas está dada por la Ecuación 4.

$$\text{Intercepto primario} = \frac{K_B}{k_{cat}} \frac{1}{[B]} + \frac{1}{k_{cat}} \quad \text{(Ecuación 4)}$$

La Gráfica obtenida usando la Ecuación 4 es llamada Gráfica secundaria (Figura 13) [Dunford, 1991].

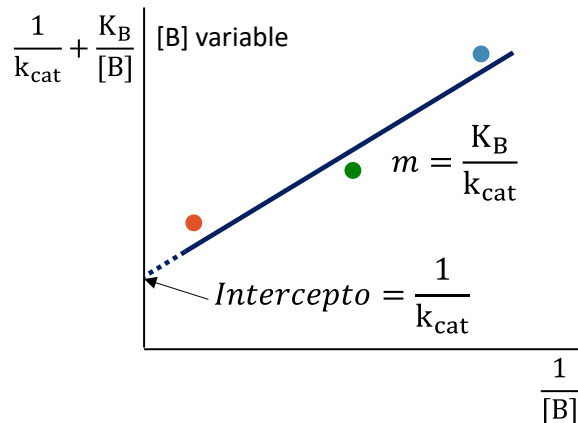


Figura 13 Gráfica secundaria.

1.2.6 Métodos espectroscópicos

La Espectroscopía estudia las interacciones de la radiación electromagnética y la materia. En muchos tipos de interacción radiación/materia es útil enfatizar la naturaleza de partícula de la luz como una corriente de fotones o cuantos. La energía de un solo fotón se relaciona con su longitud de onda (λ), frecuencia (ν) y número de onda ($\bar{\nu}$) mediante la siguiente ecuación [Skoog *et al*, 2005]:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\bar{\nu} \quad \text{(Ecuación 5)}$$

Donde h es la constante de Planck ($6.63 \times 10^{-34} \text{ Js}$).

Los métodos espectroscópicos se basan en la cuantificación de la radiación emitida o absorbida por las especies atómicas o moleculares de interés. Podemos clasificar los métodos espectroscópicos de acuerdo con la región del espectro electromagnético utilizada durante la medición. Se han utilizado las regiones de rayos γ , rayos X, ultravioleta, visible, infrarrojo, microondas y radiofrecuencias [Skoog *et al*, 2005].

La condición para que se lleve a cabo una transición electrónica o magnética es que el momento dipolar eléctrico o magnético de una molécula cambie cuando se irradia la materia con la radiación electromagnética, indicándonos que hubo una absorción de energía cuantizada y se llevó a cabo una transición de un estado basal a un estado excitado ya sea electrónico (UV-Vis), vibracional (IR), rotacional (microondas) o magnético nuclear o electrónico [Drago, 1992].

1.2.6.1 Espectroscopía de UV-Vis

La espectroscopía de ultravioleta–visible es el estudio de la absorción de la radiación electromagnética en las regiones de UV y visible de una muestra dada. También es conocida como espectroscopía electrónica porque la energía es usada para excitar electrones a niveles de alta energía [Atkins *et al*, 2010].

Existen tres reglas de selección para esta espectroscopía [Drago, 1992]:

- Para moléculas con un centro de simetría, las transiciones permitidas son de $g \rightarrow u$ o $u \rightarrow g$. Esta regla también es conocida como de Laporte.
- Las transiciones entre estados de diferente multiplicidad son prohibidas.
- Para moléculas sin un centro de simetría, las transiciones dependerán de las simetrías de los estados iniciales y finales.

Los compuestos de coordinación con metales de transición presentan una gran variedad de colores que surgen de transiciones electrónicas entre niveles cuyos espaciamentos corresponden a las longitudes de ondas disponibles en el espectro visible. En los

compuestos de coordinación, estas transiciones suelen llamarse transiciones $d-d$ porque en ellas participan orbitales atómicos d de carácter metálico. Es evidente que los colores que se producen están íntimamente relacionados con la magnitud del espaciamiento entre estos niveles. Puesto que este espaciamiento depende de factores como la geometría del compuesto de coordinación, la naturaleza de los ligantes presentes y el estado de oxidación del ion metálico central, los espectros de UV-Vis de los compuestos de coordinación proporcionan información valiosa con respecto a sus enlaces y estructura [Huheey *et al*, 2007].

1.2.6.2 Espectroscopía de IR

En general, la radiación infrarroja no es energéticamente suficiente para causar transiciones electrónicas, pero puede inducir transiciones en los estados vibracionales y rotacionales, generados por los diferentes movimientos vibracionales llamados modos normales de vibración (movimientos independientes y autorrepetitivos de la molécula) de los enlaces en la misma molécula, asociados con el estado basal electrónico de la molécula. [Skoog *et al*, 2005]

El modelo del oscilador armónico cuántico describe los movimientos vibracionales y rotacionales, entre los enlaces de la misma molécula, considerando que dos átomos están unidos por un resorte a una distancia r .

Las reglas de selección para esta Espectroscopía son las siguientes [Drago, 1992]:

- Para que las moléculas puedan absorber radiación infrarroja como energía de excitación vibracional, debe haber un cambio en el momento dipolar de la molécula cuando esta vibre.
- Solo habrá transiciones vibracionales para $\Delta v = +1$, donde v representa los estados vibracionales.

La posición de N átomos en una molécula puede ser descrita por coordenadas Cartesianas y el movimiento general de cada átomo puede ser descrito utilizando tres coordenadas de desplazamiento, entonces las moléculas tienen $3N$ grados de libertad. Ciertas combinaciones de estos grados de libertad corresponden a movimientos traslacionales y rotacionales sin cambios en las distancias de enlace, los cuales son sobre o alrededor de los ejes x , y y z . En moléculas no lineales existen $3N - 6$ modos normales de vibración que resultan en el cambio de ángulos o distancias de enlace en la molécula. En contraste, para moléculas lineales existen $3N - 5$ modos normales de vibración.

En un espectro de IR se pueden observar dos zonas:

- Una zona de $4000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ en donde se encuentran las vibraciones de deformación y tensión de los enlaces atómicos en una molécula.

- Otra zona llamada *huella digital* de $1500 - 400 \text{ cm}^{-1}$ que contiene la mayoría de las vibraciones de una molécula.

1.2.6.3 Espectroscopía de RMN- ^1H

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear estudia el comportamiento de ciertos núcleos atómicos (aquellos que poseen espín nuclear distinto de cero) en presencia de un campo magnético externo. El campo magnético aplicado produce un desdoblamiento de los niveles energéticos degenerados magnéticos del espín nuclear en un estado de menor energía y otro de mayor energía, de modo que pueden inducirse transiciones entre ellos como consecuencia de la absorción de una segunda radiación magnética adecuada perpendicular al campo magnético permanente externo. La disposición de los niveles de energía es una propiedad tanto de los núcleos de una molécula como de su entorno electrónico y de las interacciones entre ambos.

La intensidad, forma y posición de las señales en el espectro de RMN- ^1H de un núcleo de hidrogeno están íntimamente relacionadas con su estructura molecular, por lo que un análisis detallado del espectro proporciona valiosa información acerca de la estructura magnética del compuesto que lo origina. Por ello, esta técnica resulta ser de las más eficientes y útiles para el estudio de la estructura y dinámica de moléculas en disolución o en estado sólido.

Las reglas de selección para esta espectroscopía son las siguientes: $\Delta m_l = \pm 1$; $\Delta m_s = 0$.

1.2.6.4 Espectroscopía de RPE

La espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica es una espectroscopía para determinar la estructura magnética de materiales con electrones desapareados. Al incidir una frecuencia fija de radiación de microondas variando el campo magnético aplicado para inducir el Zeeman electrónico y con las microondas las transiciones de espín electrónico. En RPE el desdoblamiento de los estados de energía surgen de la interacción de los momentos de espín electrónico desapareados ($m_s = \pm 1/2$) con el campo magnético, el llamado efecto Zeeman electrónico. El Hamiltoniano del efecto Zeeman para interacción de un electrón con el campo magnético aplicado es:

$$\hat{H} = g\beta H \hat{S}_z \quad \text{(Ecuación 6)}$$

donde g para un electrón libre tiene el valor de 2.0023, β es el magnetón de Bohr, H es el campo magnético aplicado y \hat{S}_z es el operador de espín.

Las principales interacciones consideradas como contribuciones al espectro de RPE son:

- El efecto del Zeeman electrónico.
- La interacción entre el espín electrónico y el espín nuclear.

- La interacción de intercambio magnético.
- La interacción espín orbita.
- La interacción dipolar.
- El desdoblamiento de campo cero.

Para algunos sistemas también será necesario incluir el Zeeman nuclear del metal y las interacciones cuadrupolares nucleares. Para cualquier muestra paramagnética la interacción del Zeeman electrónico es expresada por el tensor g . Dependiendo de la anisotropía de los valores principales del tensor g (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz}) existen tres tipos de espectros (Figuras 14–16):

a) Isotrópico, en donde el valor de $g_{xx} = g_{yy} = g_{zz}$.

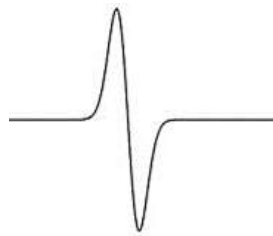


Figura 14 Espectro isotrópico.

b) Axial, en donde se tienen dos valores de g ($g_{\parallel} = g_{zz}$ y $g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$), en esta simetría existen dos formas de espectros cuando $g_{\parallel} > g_{\perp}$ y cuando $g_{\parallel} < g_{\perp}$.

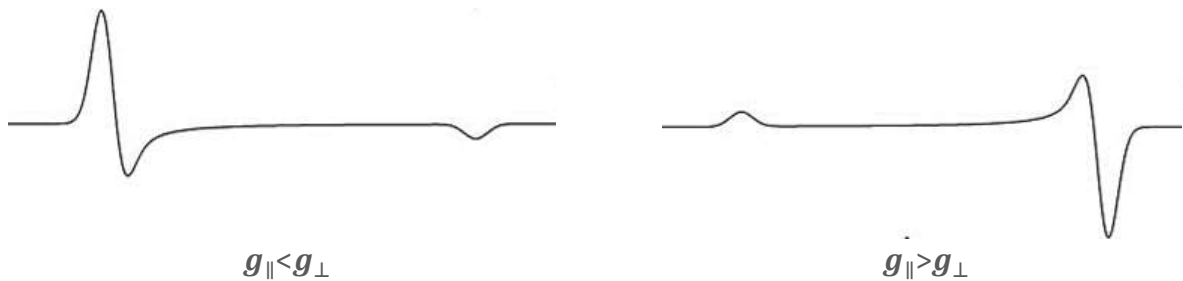


Figura 15 Espectros axiales.

c) Rómbico, en donde se tienen tres valores diferentes de g ($g_{xx} \neq g_{yy} \neq g_{zz}$).

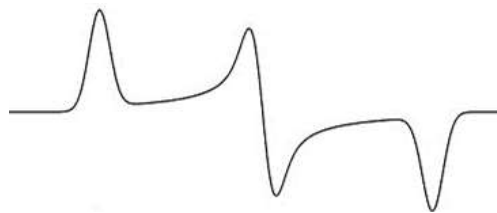


Figura 16 Espectro rómbico.

Las reglas de selección para esta Espectroscopía son: $\Delta m_l = 0$; $\Delta m_s = \pm 1$.

Con respecto a los iones de metales de transición, la Espectroscopía de EPR es ampliamente usada para estudiar compuestos de coordinación y organometálicos, en compuestos biológicos con centros de iones metálicos y en catálisis [Mabbs, 1993].

1.3 Hipótesis

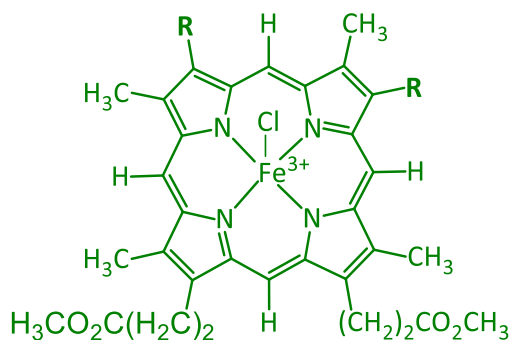
La actividad catalítica como peroxidasa de los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) puede cuantificarse mediante el modelo ping—pong peroxidasa y puede correlacionarse con las poblaciones con $s = 3/2$, $s = 5/2$ y las proporciones de los dos estados de espín de Fe(III) presentes en cada compuesto de coordinación.

1.4 Objetivo general

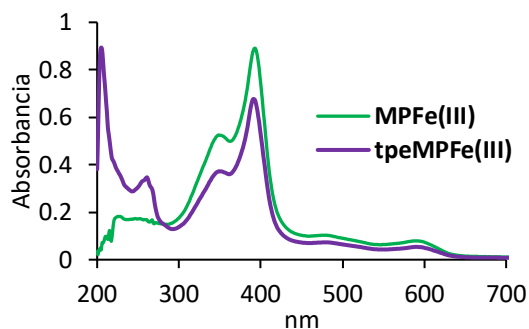
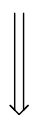
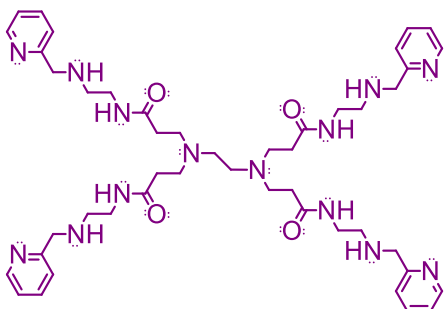
Sintetizar y caracterizar los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III), probarlos como antioxidantes y cuantificar su actividad catalítica como peroxidasa.

1.5 Objetivos específicos

1. Obtener los complejos porfirina–pinza por el método de Reyes-Ortega [Reyes *et al*, 1998]:
 - a. [(deuteroporfirinatodimetiléster)(tpe)]Fe(III), [(tpe)(DP)]Fe(III).
 - b. [(mesoporfirinatodimetiléster)(tpe)]Fe(III), [(tpe)(MP)]Fe(III).
2. Caracterizar los compuestos obtenidos por UV-Vis, IR, RMN-¹H y RPE.
3. Determinar si el comportamiento de los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) es enzimático y sigue el modelo de Michaelis–Menten.
4. Cuantificar la actividad catalítica como peroxidasa de [tpeDP]Fe(III) y [tpeMP]Fe(III) utilizando el método del guayacol característico de las peroxidasas, con la metodología de Reyes-Ortega [Reyes *et al*, 1998].
5. Obtener las constantes de velocidad y las constantes de Michaelis–Menten.
6. Correlacionar las poblaciones de espín cuánticamente mezclado de Fe(III), $s = 5/2$, $3/2$, de los compuestos obtenidos con su actividad peroxidasa y antioxidante.
7. Realizar pruebas cualitativas de [tpeDP]Fe(III) y [tpeMP]Fe(III) como antioxidantes con DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).



+



0.0068	Q	Prueba Q
0.0238	-0.103174603	Aceptado
0.0251	0.103174603	Aceptado
0.0271	0.158730159	Aceptado
0.0296	0.198412698	Aceptado
0.0299	0.023809524	Aceptado
0.0308	0.071428571	Aceptado
0.0311	0.023809524	Aceptado

CAPÍTULO 2

Metodología y tratamiento de datos

2.1 Equipos, materiales y métodos

2.2 Métodos de síntesis de [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III)

2.3 Prueba cualitativa como antioxidante

2.4 Estudios cinéticos

2.4.1 Comportamiento Michaelis – Menten

2.4.2 Tratamiento estadístico

2.1 Equipos, materiales y métodos

Se realizaron los estudios espectroscópicos de UV-Vis de [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) para monitorear la formación del compuesto de coordinación. Se prepararon disoluciones metanólicas de 3 mL DPFe(III) con *ca* (concentración aproximada) 0.029 mM y para MPFe(III) con *ca* 0.0167 mM. Se preparó una disolución de tpe con *ca* 19.066 mM en metanol por separado. Se tomaron 3 mL de la disolución de porfirina y se monitoreo a través de UV-Vis. Se adicionaron 5 μ L de la disolución del ligante tpe cada 5 minutos y se analizó a través de espectros de UV-Vis. El tiempo de reacción se determinó cuando el espectro ya no muestra algún cambio. Los espectros electrónicos y los estudios cinéticos se midieron a 25°C en un espectrofotómetro Beckman DU 7500 ($\lambda = 200 - 800$ nm) con celdas de cuarzo de 1 cm de paso de luz y utilizando el software “Wavelength Scan” y “Kinetics/Time”, respectivamente.

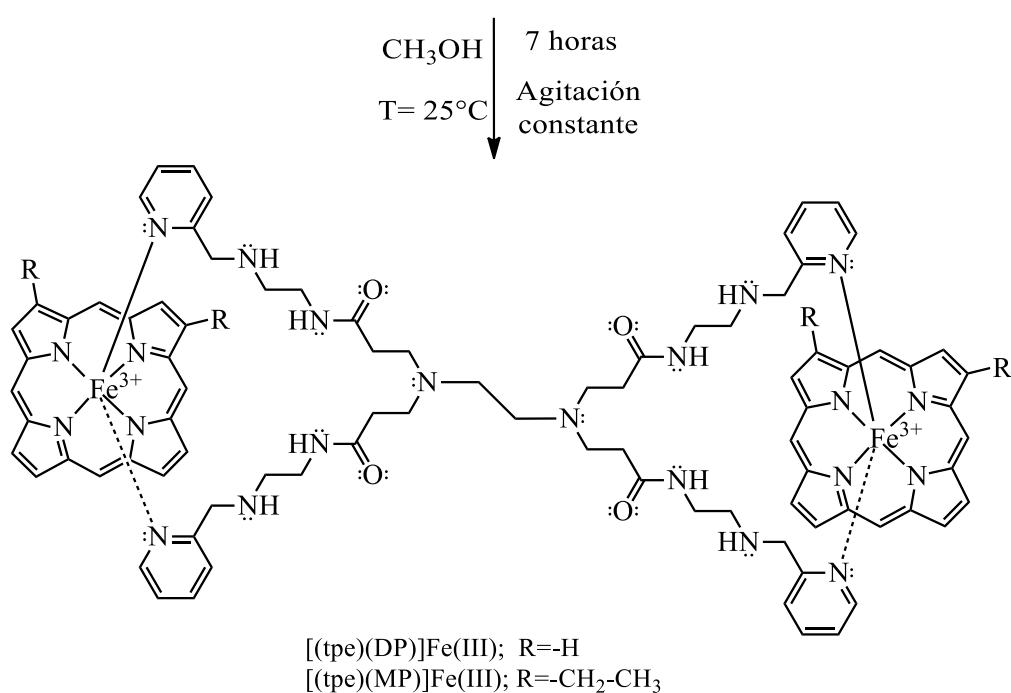
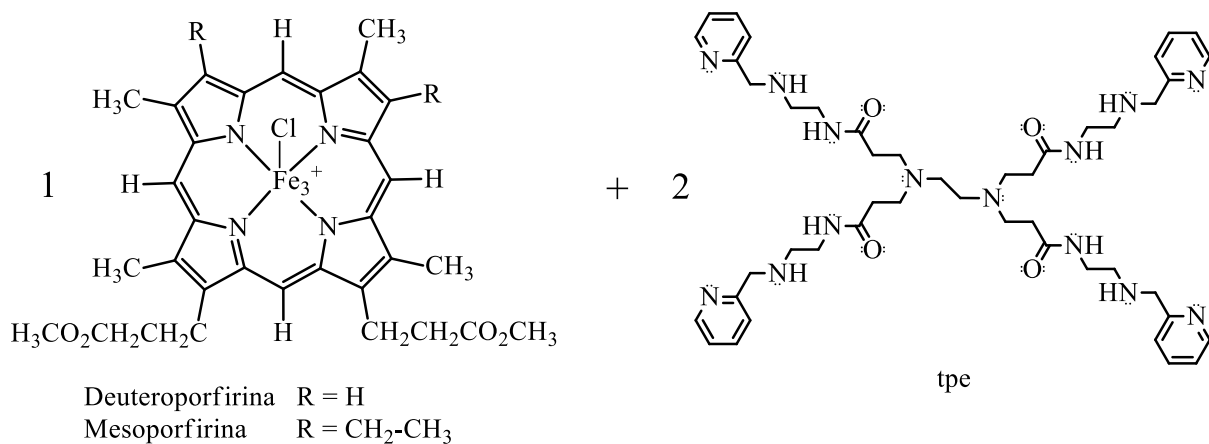
Un espectrofotómetro NicoletMagna 750 ($\nu = 400 - 4000$ cm^{-1}) se empleó para monitorear los espectros de infrarrojo de los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) y de sus porfirinas precursoras disueltas en metanol-cloroformo adicionando estas disoluciones sobre pastillas de KBr.

Se estudiaron los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) (*ca* 0.807 mM) y [(tpe)(MP)]Fe(III) (*ca* 0.765 mM) así como las correspondientes porfirinas precursoras [(Cl)(DP)]Fe(III) (*ca* 2.654 mM) y [(Cl)(MP)]Fe(III) (*ca* 2.433 mM) por RMN-¹H en un espectrómetro Bruker Avance III de 500 MHz, en un rango de 100 a -100 ppm, con 4096 barridos, tamaño de FID (Free Induction Decay) de 262144, usando CD₃OD y TMS como referencia.

Los espectros de RPE en banda-X de los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) con *ca* 0.807 mM y [(tpe)(MP)]Fe(III) con *ca* 0.765 mM así como las correspondientes porfirinas precursoras [(Cl)(DP)]Fe(III) con *ca* 2.654 mM y [(Cl)(MP)]Fe(III) con *ca* 2.433 mM fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker Elexsys-500-II a 77K y 90 K en disolución metanólica.

2.2 Métodos de síntesis de [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III)

Se preparó el dendrímero funcionalizado de acuerdo con lo reportado en la literatura [Cervantes-Mejía *et al*, 2014]. Se hicieron reaccionar las porfirinas [(Cl)(DP)]Fe(III) y [(Cl)(MP)]Fe(III) con el dendrímero tpe en una relación molar 1:2 en una disolución de metanol a temperatura ambiente y con agitación constante por 7 horas para obtener los nuevos compuestos de coordinación [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) por el método de Reyes-Ortega (Esquema 3) [Reyes *et al*, 1998].



Esquema 3 Reacción general para la obtención del compuesto [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III).

2.3 Prueba cualitativa como antioxidante

Se realizó la prueba de atrapador de electrones mediante DPPH haciendo reaccionar a [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) con DPPH en una relación molar de 1:2 en una disolución metanólica por 18 h a temperatura ambiente.

Se obtuvieron espectros cada 15 minutos las primeras dos horas y después cada hora hasta completar las 18 horas de reacción. En los espectros de UV-Vis se observa la disminución en la absorbancia de la señal del radical libre del DPPH ($\lambda_{max} = 511$) en un

valor máximo de 29% de $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ y 21% de $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ (Figura 17 y Figura 18).

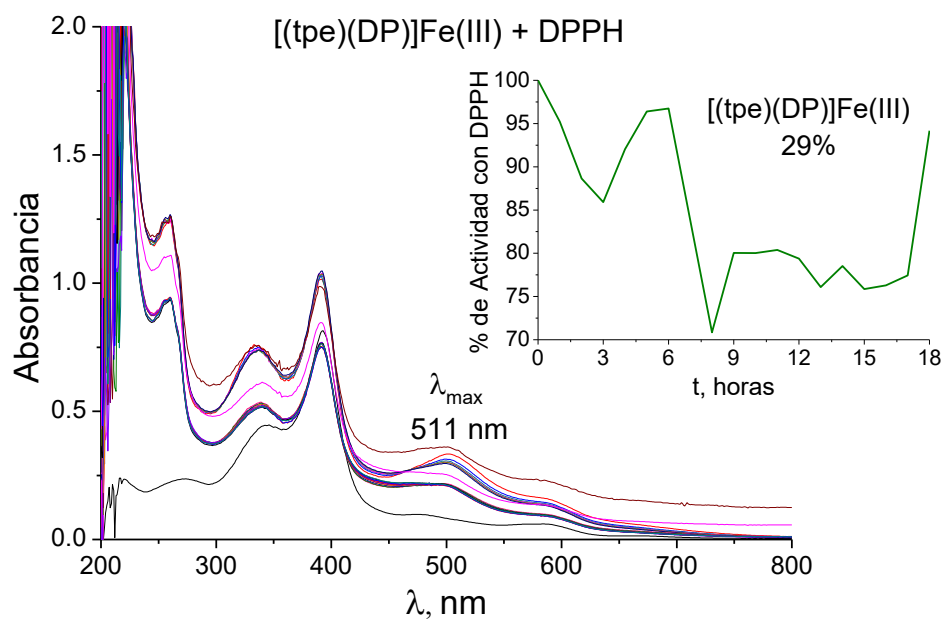


Figura 17 Seguimiento de la reacción de $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ con DPPH por UV-Vis. Espectros obtenidos en un intervalo de 0–8 horas.

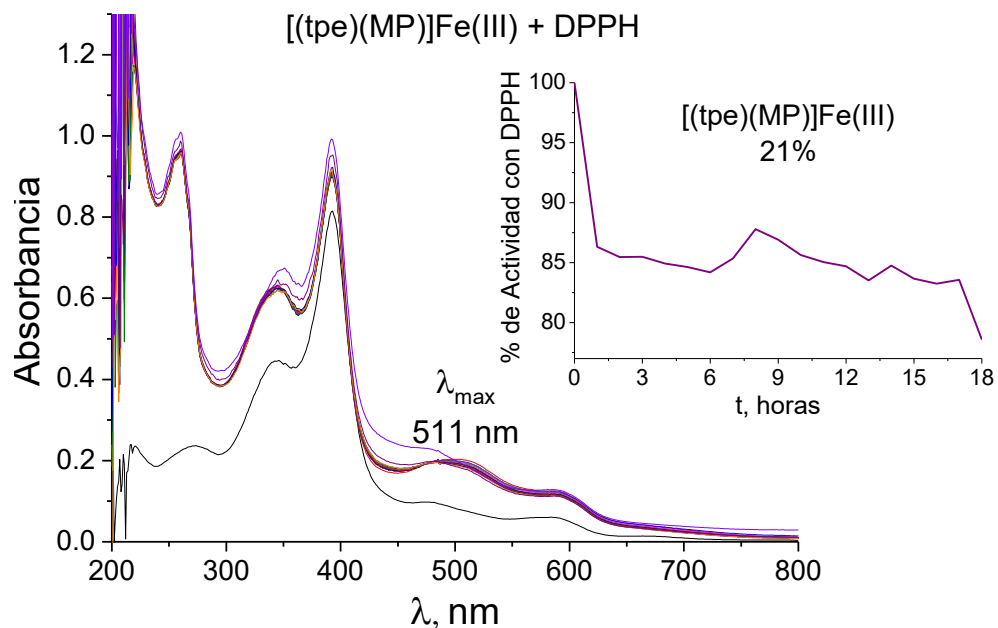


Figura 18 Seguimiento de la reacción de $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ con DPPH por UV-Vis. Espectros obtenidos en un intervalo de 0–8 horas.

2.4 Estudios cinéticos

Para probar la actividad catalítica como peroxidasa de los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) se utilizó el método de guayacol con base en las condiciones reportadas por Reyes-Ortega [Reyes *et al*, 1998]. El método consiste en medir la velocidad inicial de formación de los productos de oxidación del guayacol (POG) durante los primeros 20 segundos, determinando por espectroscopia de UV-Vis la λ_{\max} que corresponde a los POG.

Para descartar la posible formación de los POG mezclando guayacol–peróxido, guayacol–compuestos y peróxido–compuestos se hicieron pruebas cuyas condiciones se especifican en la Tabla 1. Los ensayos se observaron por espectroscopia de UV-Vis a través del tiempo (Figuras 20–22).

Tabla 1
Resultados de las pruebas de combinación de reactivos de [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III).

H₂O₂ 1400 mM	Guayacol 20.1 mM	[(tpe)(DP)]Fe(III) 0.0291 mM	[(tpe)(MP)]Fe(III) 0.0167 mM	Observaciones
50 μ L	50 μ L			No hay formación de POG (Figura 19).
	50 μ L	3 mL		No hay formación de POG (Figura 20).
	50 μ L		3 mL	No hay formación de POG (Figura 21)
50 μ L		3 mL		Autooxidación del compuesto de coordinación (Figura 22).
50 μ L			3 mL	Autooxidación del compuesto de coordinación (Figura 23).

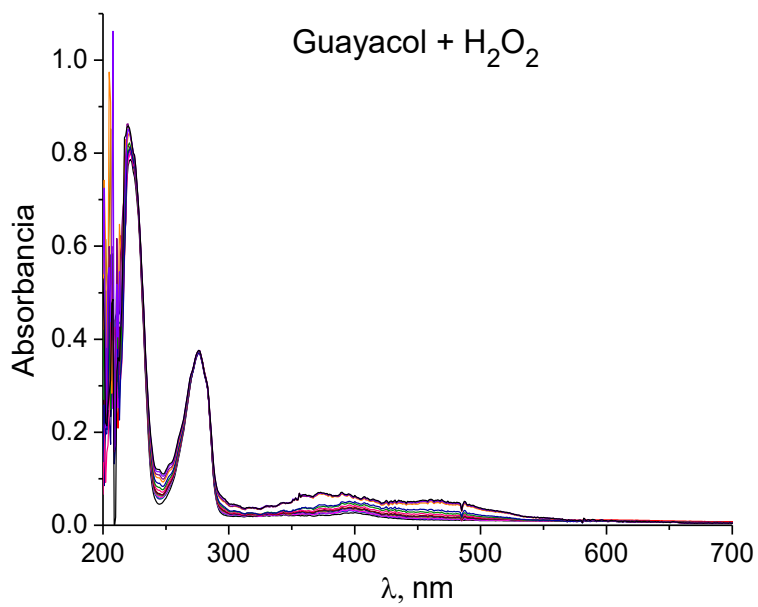


Figura 19 Seguimiento por UV-Vis de la mezcla de guayacol con H₂O₂. Espectros obtenidos en un intervalo de 0–7 horas.

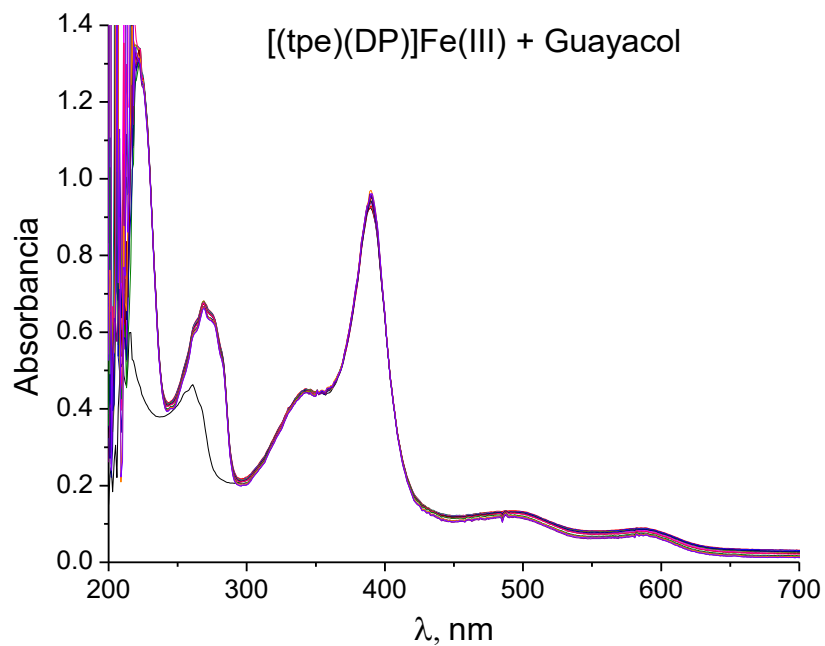


Figura 20 Seguimiento por UV-Vis de la mezcla de [(tpe)(DP)]Fe(III) con guayacol. Espectros obtenidos en un intervalo de 0–7 horas.

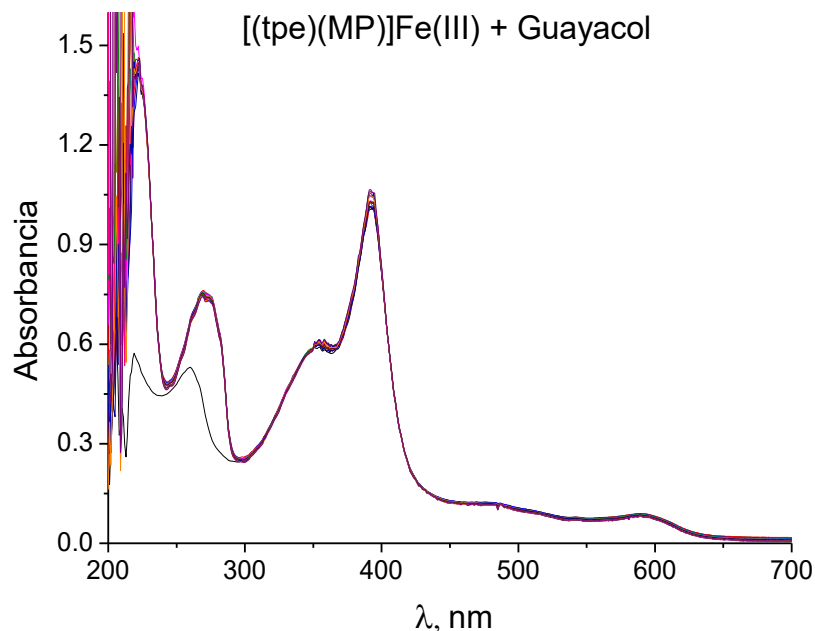


Figura 21 Seguimiento por UV-Vis de la mezcla de [(tpe)(MP)]Fe(III) con guayacol. Espectros obtenidos en un intervalo de 0–7 horas.

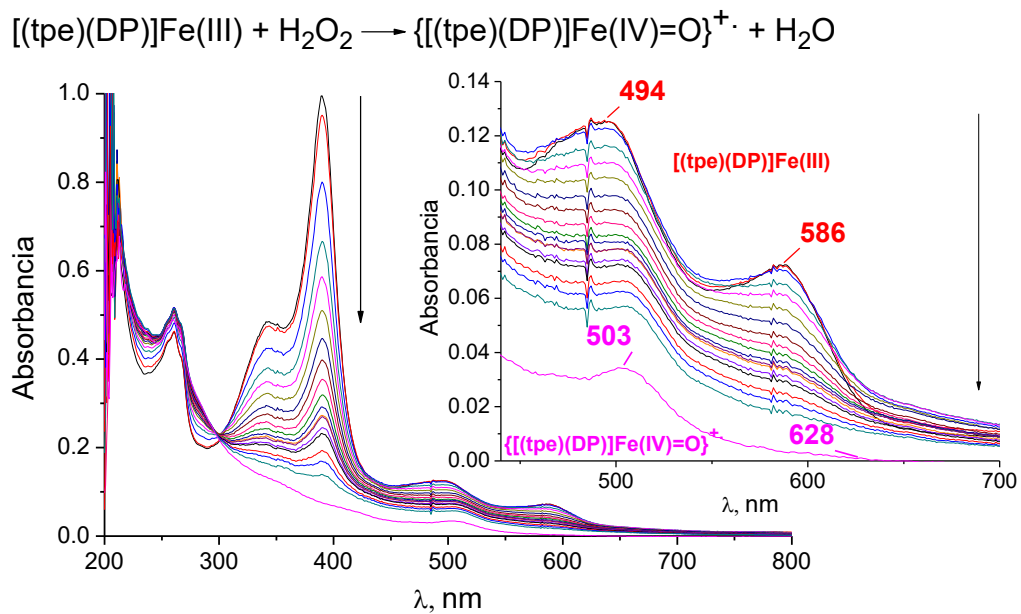


Figura 22 Seguimiento de la reacción de [(tpe)(DP)]Fe(III) con H_2O_2 por UV-Vis. Espectros obtenidos en un intervalo de 0–20 horas.

Las Figuras 20–23 muestran las bandas de los productos de la reacción que no corresponden a la banda de formación de POG, y que se discuten en el Capítulo 3, inciso 3.6. En las Figuras 24 y 25 se observan los espectros de formación de los POG.

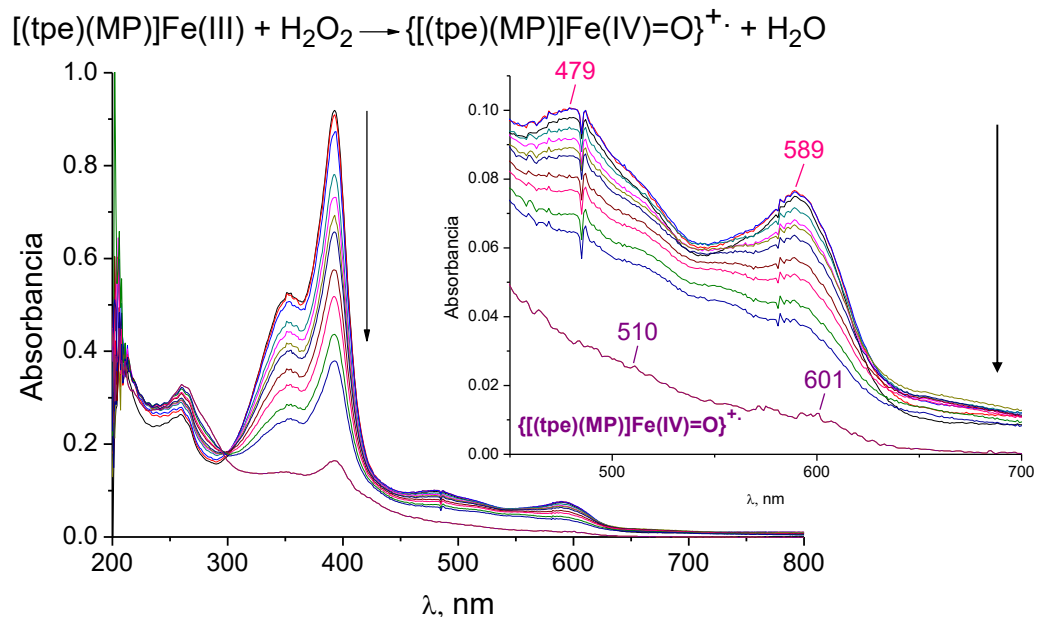


Figura 23 Seguimiento de la reacción de $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ con H_2O_2 por UV-Vis. Espectros obtenidos en un intervalo de 0–20 horas.

Se determinó la longitud de onda ($\lambda_{max} = 456, 457$) en la cual se observan los POG haciendo reaccionar 50 μL de guayacol, 50 μL de H_2O_2 y 3 mL de $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ (Figura 24) y $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ (Figura 25).

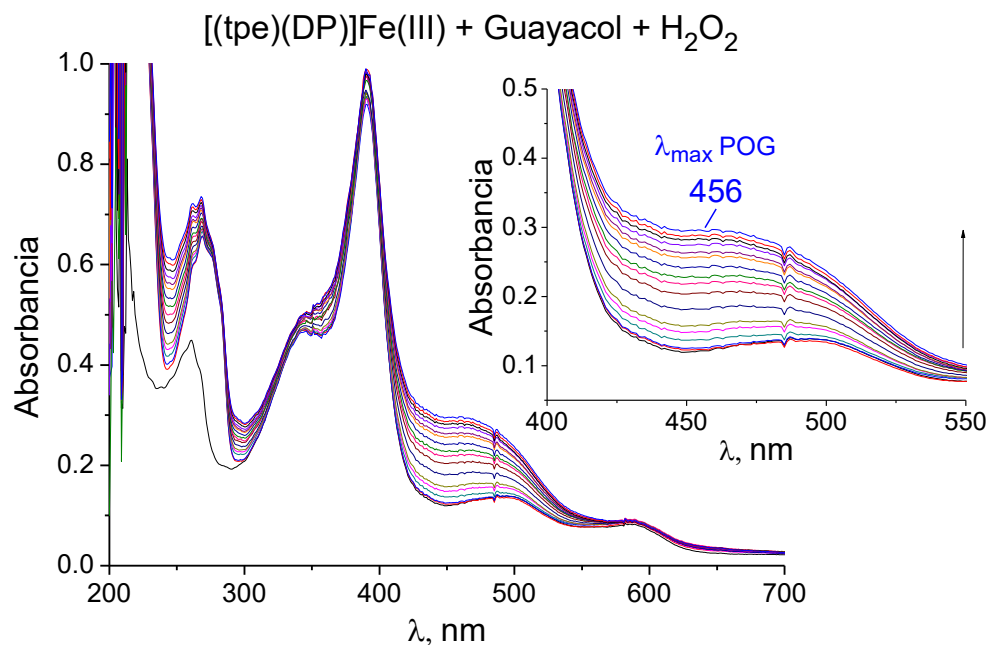


Figura 24 Seguimiento por UV-Vis de la formación de los POG de $[(tpe)(DP)]Fe(III)$. Espectros obtenidos en un intervalo de 0–5 horas.

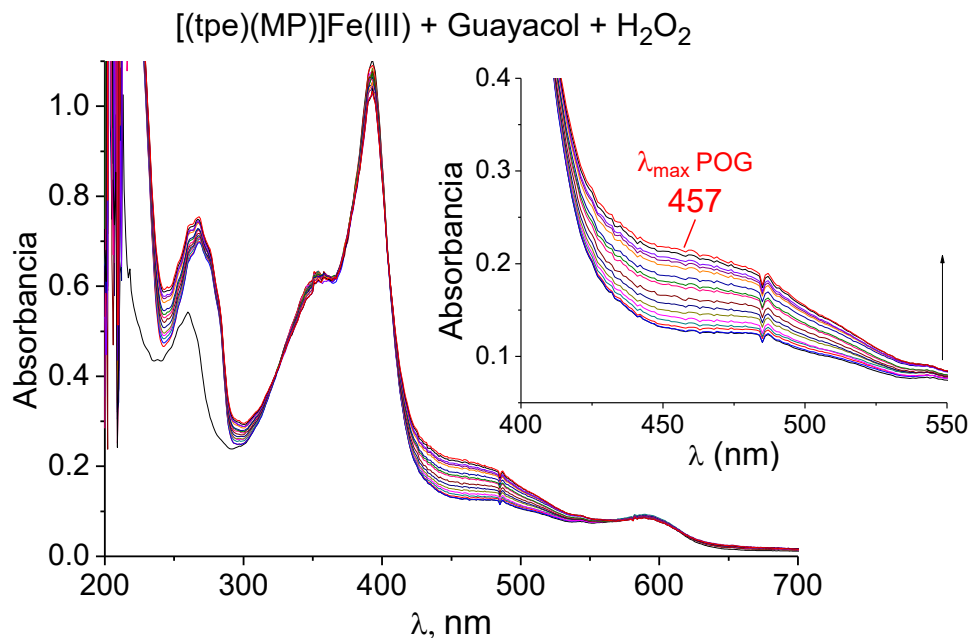


Figura 25 Seguimiento por UV-Vis de la formación de los POG de [(tpe)(MP)]Fe(III). Espectros obtenidos en un intervalo de 0–5 horas.

2.4.1 Comportamiento Michaelis – Menten

Comportamiento Michaelis-Menten (Capítulo 1, inciso 1.2.5). Se realizaron tres tipos de experimentos. En el primero, se varió la concentración de los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) observándose una línea recta en la gráfica cinética correspondiente al modelo enzimático de Michaelis –Menten [Bohinski, 1987; Nelson & Cox, 2009] sin observarse saturación. Los datos obtenidos se ajustaron a una línea recta por mínimos cuadrados (Figura 26 y Figura 27).

En una celda de cuarzo de 3.5 mL se mezclaron disoluciones de [(tpe)(DP)]Fe(III) o [(tpe)(MP)]Fe(III) con guayacol, se agregó H_2O_2 a la mezcla agitándose, manteniéndose la concentración constante de dos de los reactivos. Inmediatamente se introdujo la celda en el espectrofotómetro UV-Vis. Se inició la medición usando el software para cinética del mismo equipo. La misma prueba se repitió de 10 o 12 veces. El tiempo de reacción para cada medición fue de 15 – 20 segundos y la v_0 se tomó de 0 a 15 segundos.

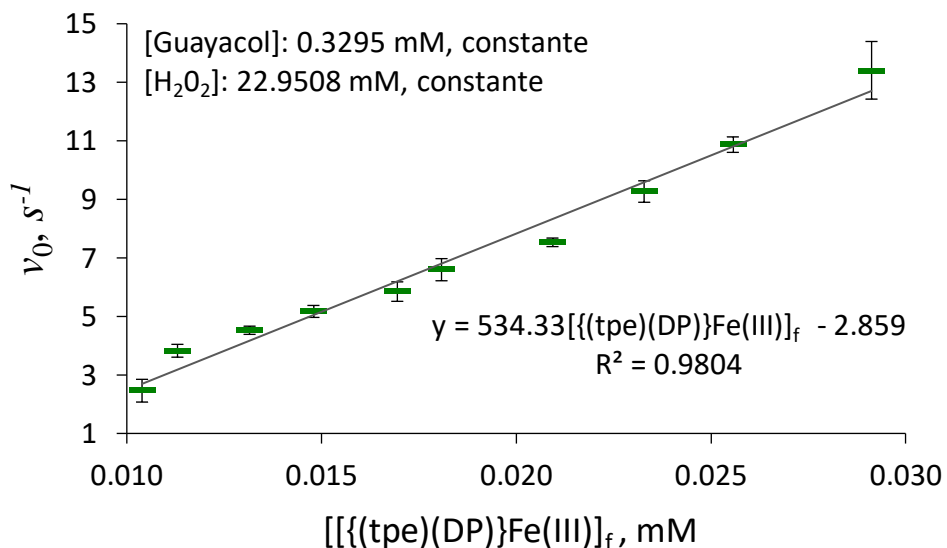


Figura 26 Comportamiento típico Michaelis – Menten cuando se varió la concentración de [(tpe)(DP)]Fe(III), n = 12 y barras de error = desviación estándar (S).

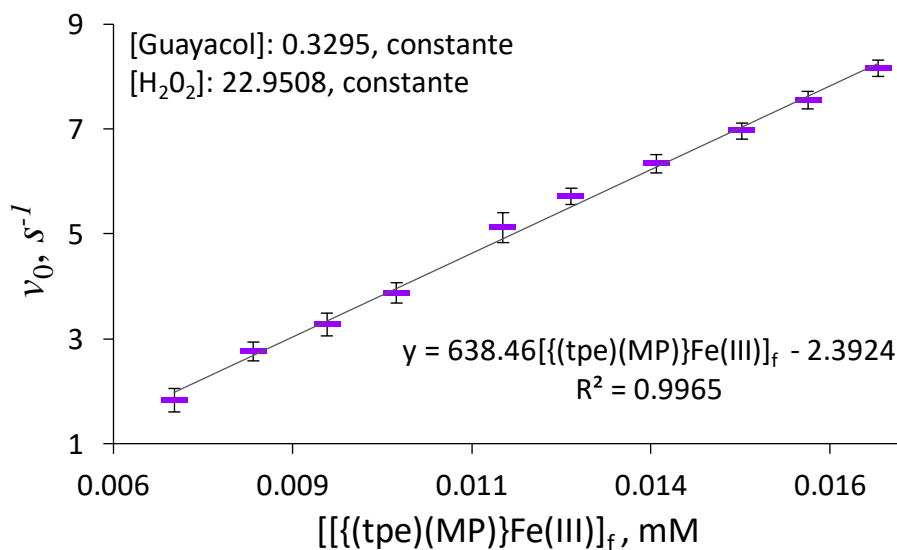


Figura 27 Comportamiento típico Michaelis – Menten cuando se varió la concentración de [(tpe)(MP)]Fe(III), n = 12 y barras de error = S.

En el segundo y tercero, se varió la concentración de H₂O₂ (Figura 28 y Figura 29) y guayacol (Figura 30 y Figura 31) observándose curvas hiperbólicas en la gráfica cinética correspondiente al modelo enzimático de Michaelis – Menten [Bohinski, 1987; Nelson & Cox, 2009] observándose saturación en ambos casos, lo que indica que el H₂O₂ y el guayacol se comportan como sustratos y los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) se comportan como la enzima. Los datos obtenidos se ajustaron a una curva logarítmica, propia de la función clásica de Michaelis – Menten (Ecuación 2):

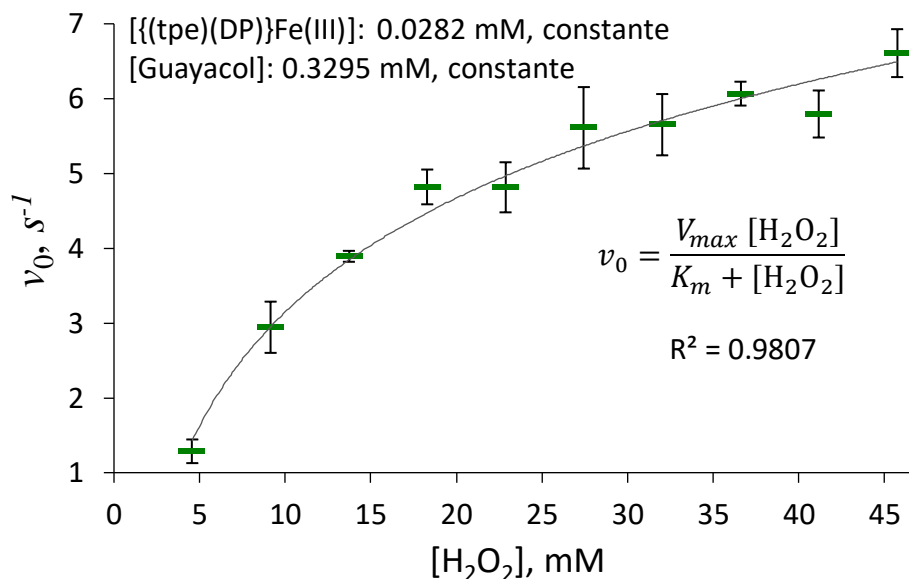
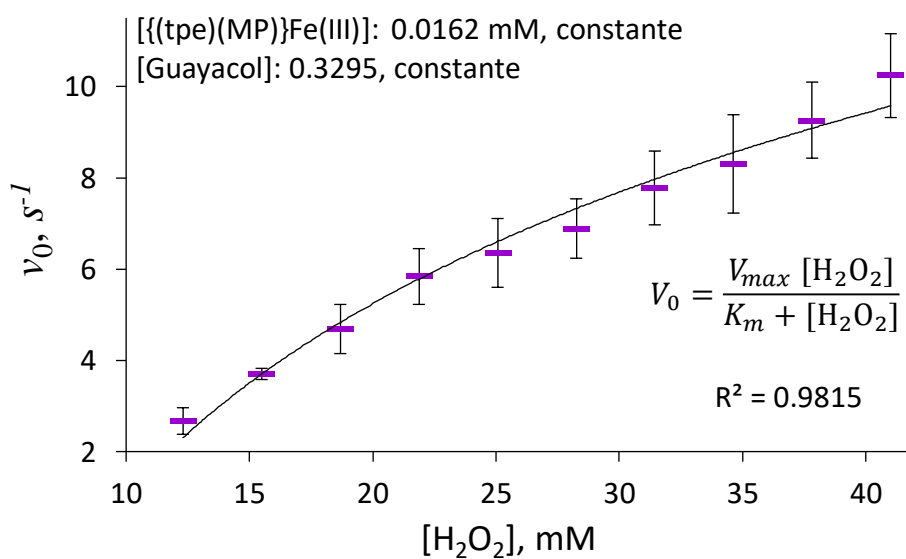


Figura 28 Comportamiento típico Michaelis – Menten de $[(\text{tpe})(\text{DP})\text{Fe}(\text{III})]$ cuando se varió la concentración de H_2O_2 , $n = 11-12$ y barras de error = S.



Gráfica 29 Comportamiento típico Michaelis – Menten de $[(\text{tpe})(\text{MP})\text{Fe}(\text{III})]$ cuando se varió la concentración de H_2O_2 , $n = 11-12$ y barras de error = S.

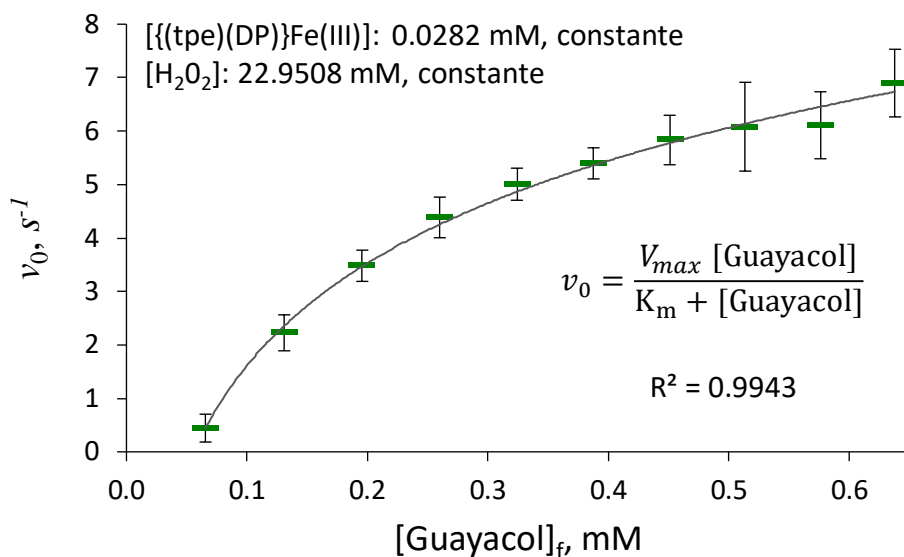


Figura 30 Comportamiento típico Michaelis – Menten de [(tpe)(DP)]Fe(III) cuando se varió la concentración de Guayacol, n = 11–12 y barras de error = S.

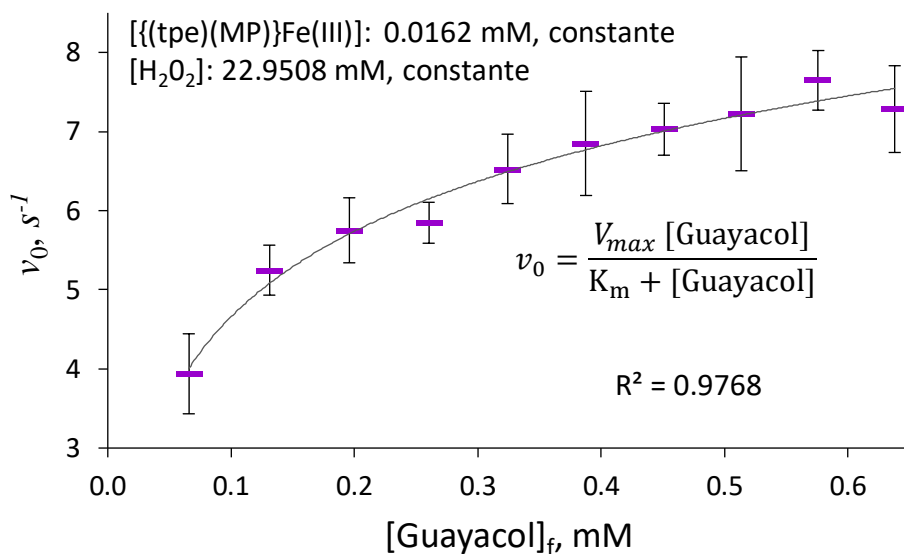


Figura 31 Comportamiento típico Michaelis – Menten de [(tpe)(MP)]Fe(III) cuando se varió la concentración de Guayacol, n = 11–12 y barras de error = S.

En la Tabla 2 se indican los intervalos de concentración de los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) o [(tpe)(MP)]Fe(III), guayacol y H₂O₂ utilizados para construir las gráficas en las Figuras 26 a 31.

Tabla 2

Intervalos de concentraciones utilizados para determinar los parámetros cinéticos del comportamiento Michaelis-Menten.

Compuesto	Concentración mM	[Guayacol] _f mM	[H ₂ O ₂] _f mM
[(tpe)(DP)]Fe(III)	0.0104 – 0.0291	0.0657 – 0.6381	4.5752 – 45.7516
[(tpe)(MP)]Fe(III)	0.0068 – 0.0167	0.0657 – 0.6381	12.3047 – 40.1274

2.4.2 Tratamiento estadístico

El tratamiento estadístico consiste en aplicar la prueba Q a los datos de v_0 obtenidos por UV-Vis para cada prueba, utilizando la ecuación ec. 2.2 [Skoog *et al*, 2005]. Este método estadístico se usa para poblaciones ≤ 10 comparando el valor de Q obtenido de los datos experimentales con un parámetro cinético que asegura el porcentaje de confianza que se elija, desde 99% hasta 90%.

$$Q = \frac{|X_q - X_n|}{|R|} \quad \text{(Ecuación 7)}$$

Donde X_q es el resultado discordante, X_n el valor más cercano al resultado discordante y R es el rango. Si Q es mayor que Q crítico (0.412 o 0.376), para las diez o doce observaciones con un porcentaje de confianza del 90%, el resultado puede rechazarse [Rorabacher, 1991].

Una vez aceptados los datos se procede a calcular el promedio \bar{X} (Ecuación 8) y la desviación estándar S (Ecuación 9) de v_0 para cada prueba (Tablas 3 – 28):

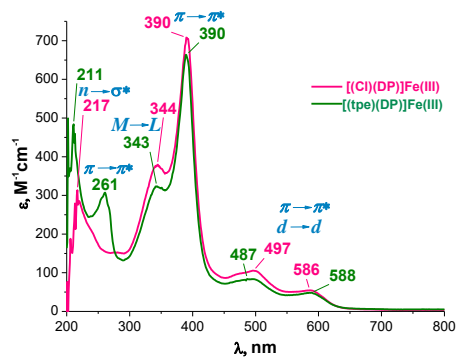
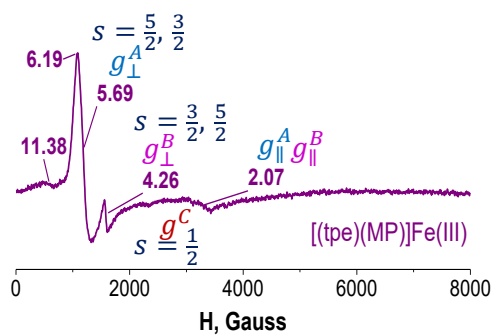
$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \text{(Ecuación 8)}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \text{(Ecuación 9)}$$

La Tabla 3 es mostrada como ejemplo del tratamiento de datos. Las Tablas 4–28 se muestran en el Apéndice 2 debido a que todas se trataron estadísticamente de la misma forma.

Tabla 3Comportamiento Michaelis – Menten. Velocidades iniciales de variación de [(tpe)(DP)]Fe(III) con [H₂O₂] y [Guayacol] constantes.

s⁻¹	[tpeDPFe(III)], Mm									
	0.010	0.011	0.013	0.015	0.017	0.018	0.021	0.023	0.026	0.029
v₀₁	1.884	3.492	4.338	4.842	5.466	6.012	7.230	8.784	10.464	12.006
v₀₂	1.956	3.576	4.380	4.872	5.496	6.060	7.374	8.976	10.494	12.102
v₀₃	2.052	3.636	4.392	4.908	5.526	6.162	7.392	8.988	10.692	12.516
v₀₄	2.142	3.666	4.428	5.070	5.622	6.480	7.476	9.000	10.710	12.804
v₀₅	2.226	3.684	4.440	5.142	5.688	6.546	7.500	9.048	10.740	12.942
v₀₆	2.472	3.792	4.488	5.178	5.754	6.570	7.548	9.132	10.794	13.422
v₀₇	2.646	3.858	4.530	5.274	5.826	6.576	7.572	9.222	10.944	13.452
v₀₈	2.736	3.876	4.566	5.286	5.832	6.756	7.584	9.252	10.992	13.566
v₀₉	2.778	4.032	4.602	5.304	5.958	6.798	7.620	9.450	11.010	14.130
v₀₁₀	2.832	4.050	4.632	5.358	6.198	6.942	7.632	9.510	11.112	14.208
v₀₁₁	2.892	4.110	4.752	5.394	6.300	7.074	7.686	9.858	11.148	14.718
v₀₁₂	2.916	4.134	4.758	5.406	6.492	7.164	7.758	9.972	11.322	15.054
\bar{X}_{v_0}	2.461	3.826	4.526	5.170	5.847	6.595	7.531	9.266	10.869	13.410
S	0.388	0.219	0.140	0.204	0.332	0.378	0.147	0.366	0.264	0.985



3

CAPITULO Resultados y su discusión

3.1 UV-Vis

3.2 IR

3.3 RMN-¹H

3.4 RPE

3.5 Prueba cualitativa como antioxidante

3.6 Detección de la formación del radical π -cатиónico ferrilo $[\text{Por-Fe(IV)=O}]^{\cdot+}$ por UV-Vis y RPE

3.7 Cuantificación de K_M y de k_{cat}

3.1 UV–Vis

En una porfirina desmetalada, el espectro de absorción está determinado esencialmente por los 18 electrones π del anillo porfirínico y sus transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ [Adar & Dolphin, 1978; Gouterman & Dolphin, 1978]. Este anillo presenta cuatro bandas en la región visible y una banda en la de ultravioleta. La banda que se encuentra en la región ultravioleta es llamada banda Soret o B. Las cuatro bandas que se encuentran en la región visible (también conocidas como bandas Q) corresponden a una simetría D_{2h} [Owens & O'Connor, 1988] (Figura 32).

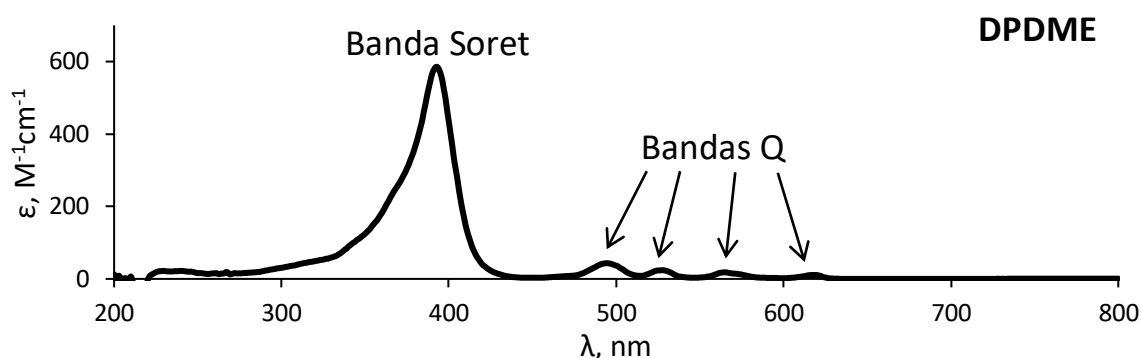


Figura 32 Espectro de UV–Vis de DPDME (Deuterioporfirinadimetiléster).

Cuando un metal se coordina al anillo de porfirina la simetría aumenta a D_{4h} debido a la sustitución de los dos hidrógenos del pirrol. Esto reduce el número de bandas en la región visible de cuatro a dos. La posición de estas dos bandas depende del estado de espín del metal, la basicidad del ligante y el estado de oxidación del metal. La banda Soret presenta un hombro debido al acoplamiento electrónico – vibracional de la banda B del anillo de porfirina y la vibración $a_{1g}(d_{z^2})$ del metal [Owens & O'Connor, 1988] (Figura 33).

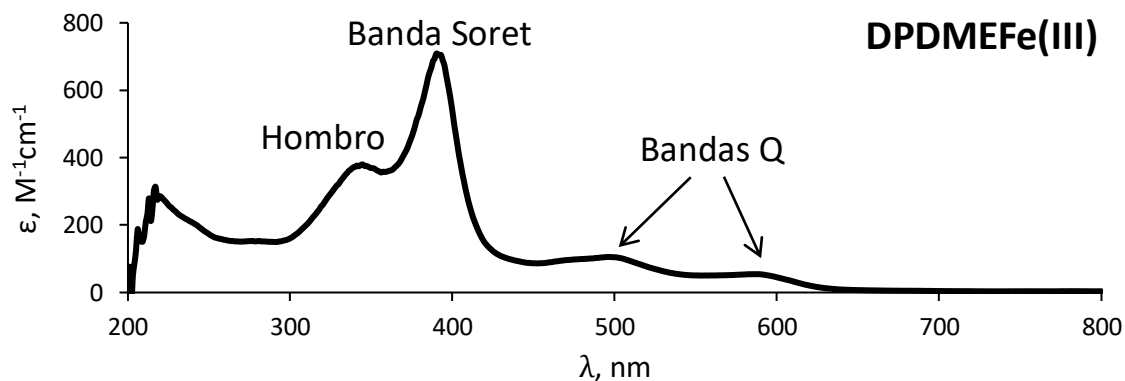


Figura 33 Espectro de UV–Vis de DPDMEFe(III).

Las bandas que presentan los espectros de UV–Vis de los compuestos de coordinación que se reporta en este trabajo son características de este tipo de compuestos: una muy intensa llamada Soret (380 - 420 nm) y dos bandas Q (500 – 600 nm) que corresponden a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ mezclado con transiciones $d-d$ prohibidas por simetría. La aparición de las dos bandas Q indica la coordinación del ligante porfirínico al ion Fe(III). La disminución en la intensidad de la absorción de la banda Soret y el desplazamiento de las bandas Q se da cuando se coordina axialmente al Fe(III), a través de los átomos de N de los piridilos del ligante tpe. Las dos bandas Q son características de una simetría distorsionada dependiendo de la posición del ion Fe(III) arriba del plano de la porfirina de acuerdo con los cálculos teóricos de Zerner [Owens & O'Connor, 1988; Dolphin, 1978; Reyes — Ortega, 1998; Zerner *et al.*, 1966].

En las porfirinas férricas la carga del Fe(III) está parcialmente neutralizada con los dos electrones de los nitrógenos de los pirroles más el contraión cloruro. El Fe(III) penta o hexacoordinado crea una distorsión axial y es desplazado a lo largo del eje z del plano de la porfirina a diferentes distancias dependiendo de la fuerza de campo ligante [Owens & O'Connor, 1988].

El espectro de UV–Vis de [(tpe)(DP)]Fe(III) en CH₃OH presenta una banda $\pi \rightarrow \pi^*$ característica del ligante tpe en 261 nm, un hombro en 343 nm perteneciente a una banda de transferencia de carga $M \rightarrow L$ (metal–ligante), una banda Soret en 390 nm y dos bandas Q en 487 y 588 nm (Figura 34). Por otra parte, el espectro de UV–Vis en CH₃OH de [(tpe)(MP)]Fe(III) presenta una banda $\pi \rightarrow \pi^*$ característica del ligante tpe en 260 nm, un hombro en 353 nm perteneciente a una banda de transferencia de carga $M \rightarrow L$, una banda Soret en 393 nm y dos bandas Q en 468 y 592 nm (Figura 35).

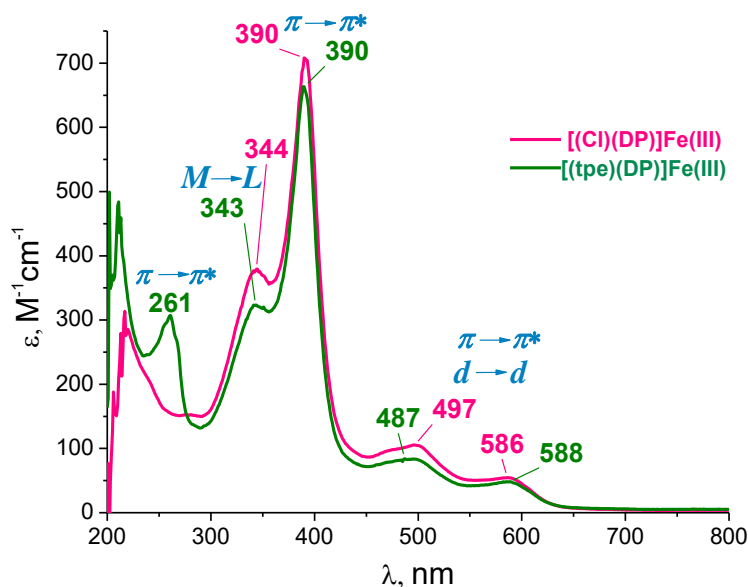


Figura 34 Espectros de UV–Vis de los compuestos [(Cl)(DP)]Fe(III) – [(tpe)(DP)]Fe(III).

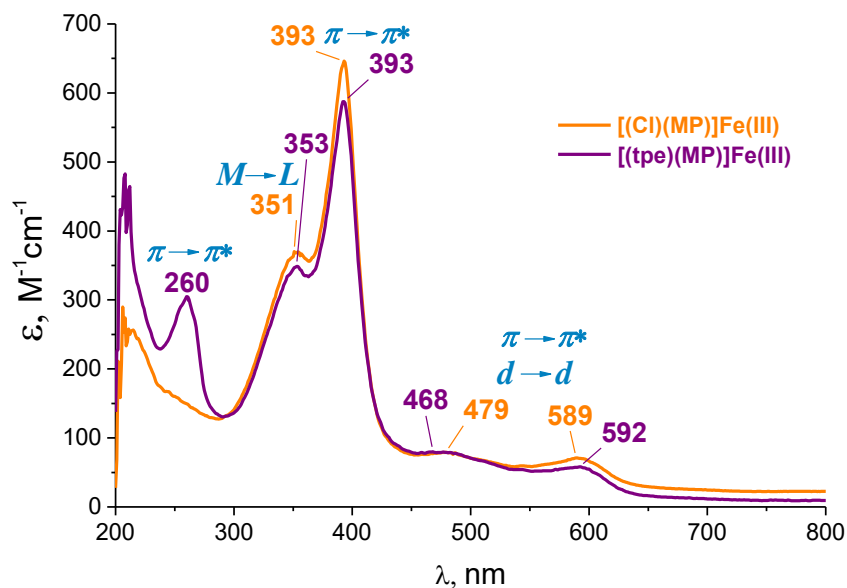


Figura 35 Comparación de los espectros de UV–Vis de los compuestos $[(Cl)(MP)]Fe(III)$ – $[(tpe)(MP)]Fe(III)$.

Además, se calculó el ΔQ como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 29

Posición de las bandas que presentan los espectros de UV–Vis de los compuestos $[(Cl)(DP)]Fe(III)$ – $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ y $[(Cl)(MP)]Fe(III)$ – $[(tpe)(MP)]Fe(III)$.

Compuesto	tpe	Hombro (nm)	Soret	Q_1 (nm)	Q_2 (nm)	ΔQ (nm)
$[(Cl)(DP)]Fe(III)$	-	344	390	497	586	89
$[(tpe)(DP)]Fe(III)$	261	343	390	487	588	101
$[(Cl)(MP)]Fe(III)$	-	351	393	479	589	110
$[(tpe)(MP)]Fe(III)$	260	353	393	468	592	124

Como se puede apreciar en la Tabla 29 el aumento del valor de ΔQ de los compuestos $[(Cl)(DP)]Fe(III)$ – $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ de 89 nm a 101 nm sugiere que el compuesto $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ tiene un mayor carácter de espín 5/2 que 3/2 en la mezcla cuántica del estado de espín [Reyes – Ortega *et al*, 1998]. Además, el mayor carácter de espín 5/2 nos sugiere que el hierro se ha desplazado fuera del plano de la porfirina [Maltempo & Moss, 1976]. Los compuestos $[(Cl)(MP)]Fe(III)$ – $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ presentan el mismo comportamiento.

3.2 IR

Los espectros de IR de $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ y $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ se compararon con sus porfirinas precursoras y el ligante tpe presentando las siguientes bandas (Figura 36):

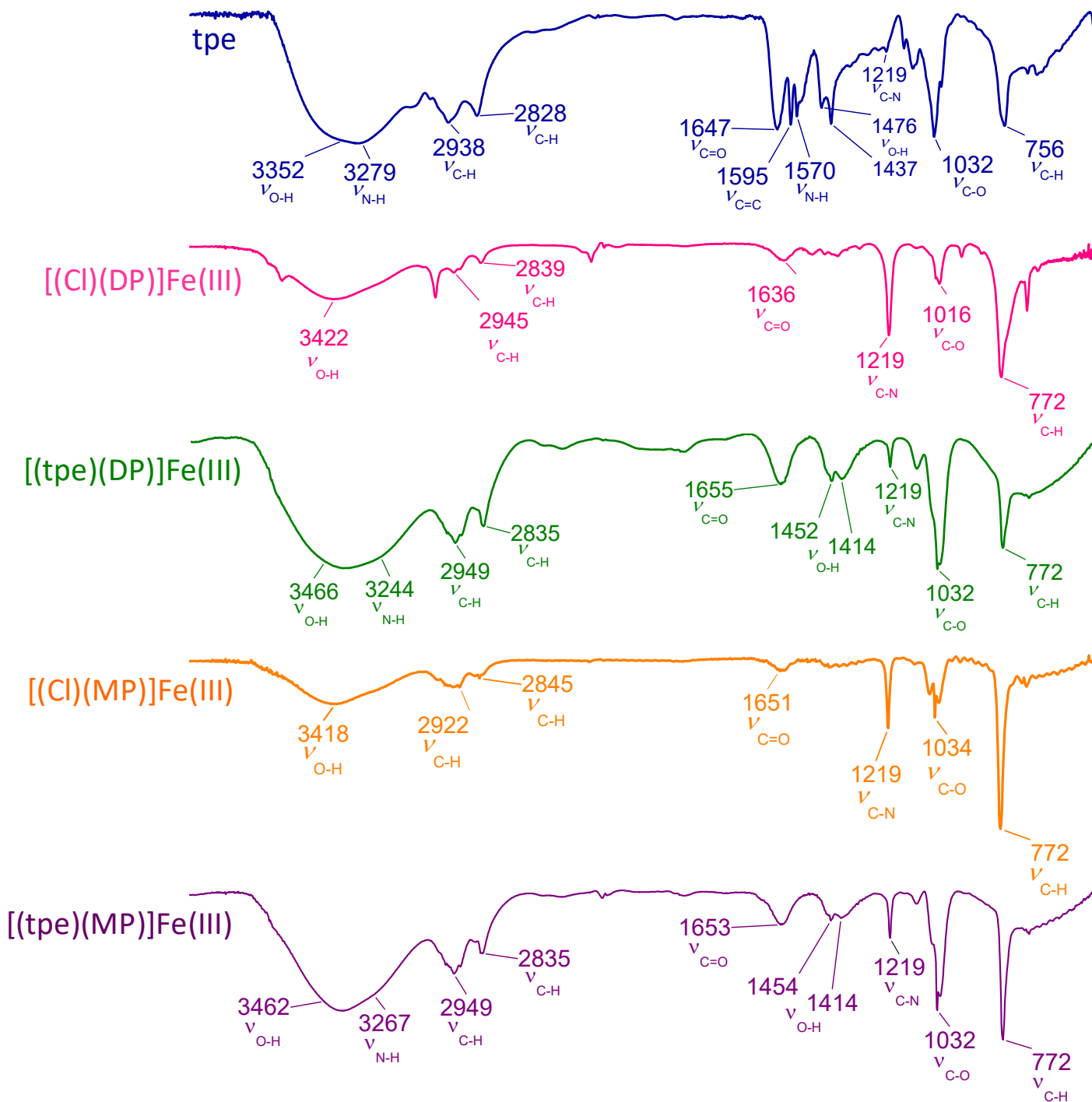


Figura 36 Espectros de IR, con ν en cm^{-1} , de los compuestos $[DP]Fe(III)$ – $[(tpe)(DP)]Fe(III)$, $[MP]Fe(III)$ – $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ y el ligante libre.

En los espectros de IR de [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) se observan las bandas características del ligante tpe, confirmando la coordinación de este. Al compararlos con sus porfirinas precursoras y el ligante tpe hay un cambio en la forma de línea. En la Tabla 30 se resumen las vibraciones moleculares más importantes observadas de cada compuesto.

Tabla 30

Posición de las bandas vibracionales que presentan los espectros de IR de los compuestos tpe, (Cl)(DP)]Fe(III) – [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(Cl)(MP)]Fe(III) – [(tpe)(MP)]Fe(III).

Compuesto	Enlace (cm ⁻¹)						
	ν_{O-H}	ν_{N-H}	ν_{C-H}		$\nu_{C=O}$	ν_{C-N}	ν_{C-O}
tpe	3352	3279	2938	2828	1647	1219	1032
[(Cl)(DP)]Fe(III)	3422	–	2945	2839	1636	1219	1016
[(tpe)(DP)]Fe(III)	3466	3244	2949	2835	1655	1219	1032
[(Cl)(MP)]Fe(III)	3418	–	2922	2845	1651	1219	1034
[(tpe)(MP)]Fe(III)	3462	3267	2949	2835	1653	1219	1032

Las ν_{O-H} , ν_{C-H} y $\nu_{C=O}$ de [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) se desplazaron a mayores energías en comparación con las porfirinas precursoras y el ligante tpe, ello indica que estos enlaces necesitan mayor energía para vibrar y por tanto disminuyó su longitud de enlace. Las ν_{N-H} de [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) se desplazaron a menor energía en comparación con el ligante tpe, debido a que estos enlaces necesitan menor energía para vibrar y por tanto aumentó su longitud de enlace. La ν_{C-N} no presentó cambios en su posición, pero la banda disminuyó en intensidad en [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) en comparación con las porfirinas precursoras, pues disminuyó la permitividad de esta transición vibracional. La ν_{C-O} aumentó en intensidad en [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) en comparación con las porfirinas precursoras, indicándonos que aumentó la permitividad de esta transición vibracional [Pretsch *et al*,2009].

3.3 RMN-¹H

En la Figura 37 se muestran los espectros de RMN-¹H de [(Cl)(DP)]Fe(III) – [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(Cl)(MP)]Fe(III) – [(tpe)(MP)]Fe(III). En estos espectros podemos localizar las señales correspondientes al hemo-CH₃, tpe, α -CH₂ y meso-H y debido a que no se encontraron desplazamientos isotrópicos con $\delta > 70$ ppm. Ello indica que el compuesto posee ecm [Boersma & Goff, 1982]. En la Tabla 31 se puede observar que las señales de [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) se desplazaron a menores ppm en comparación con sus porfirinas precursoras. Los protones están menos afectados por la densidad de espín que generan los electrones desapareados del ion Fe(III) debido a la coordinación del ligante tpe.

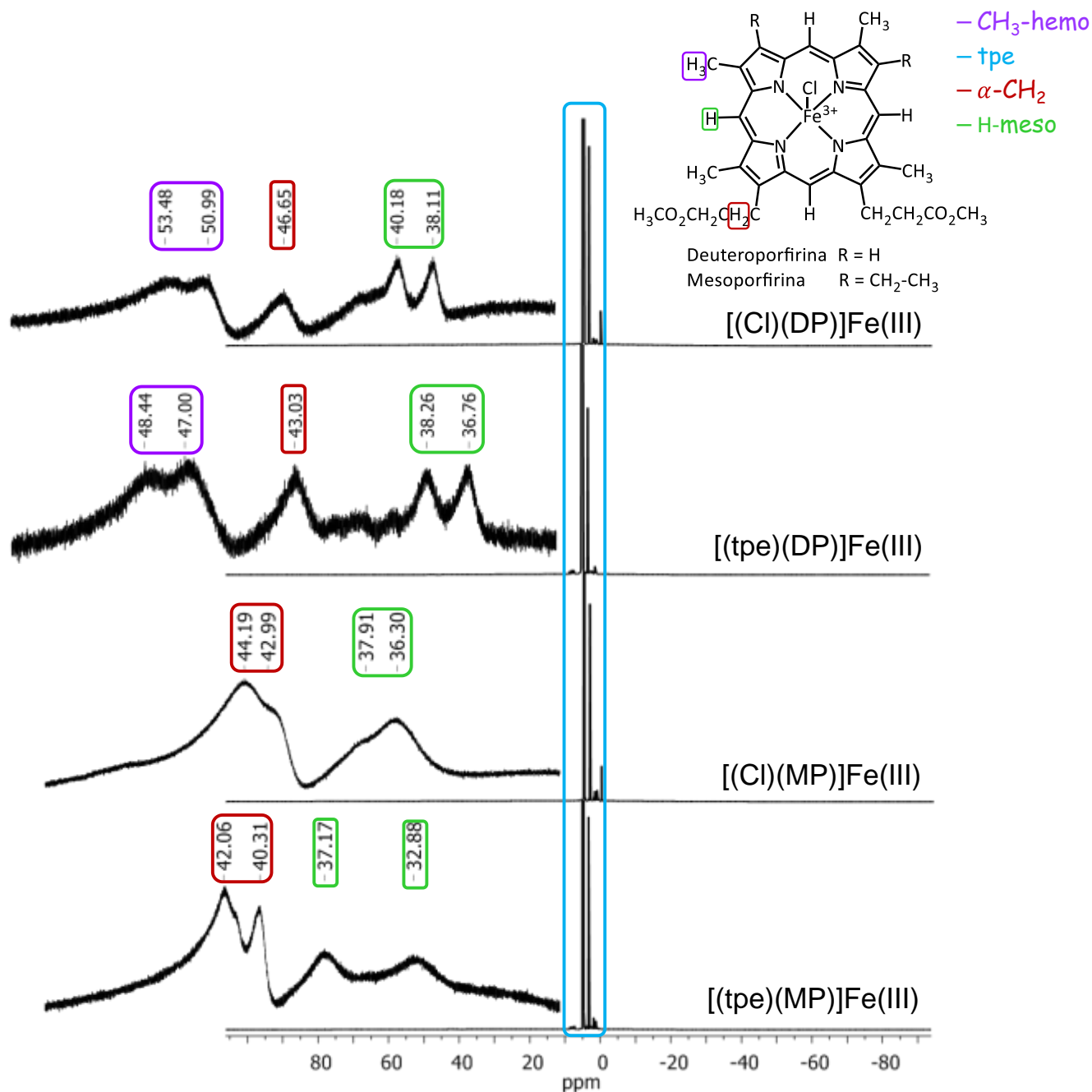


Figura 37 Espectros de RMN- ^1H de los compuestos [(Cl)(DP)]Fe(III) – [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(Cl)(MP)]Fe(III) – [(tpe)(MP)]Fe(III).

Estos espectros son típicos de compuestos paramagnéticos con desplazamientos isotrópicos de 100 a -100 ppm, las señales son anchas debido a la presencia de los electrones desapareados que proveen mecanismos de relajación nuclear eficientes y tiempos relajación cortos. La zona central es llamada zona diamagnética, está en el intervalo de 0 a 10 ppm. En esta zona aparecen los protones que están menos afectados

por la densidad de espín que generan los electrones desapareados del ion Fe(III). Por lo tanto, no son tan efectivos los mecanismos de relajación nuclear y las señales son más agudas [Budd et al, 1979].

Tabla 31

Posición de los desplazamientos químicos que presentan los espectros de RMN-¹H de los compuestos (Cl)(DP)]Fe(III) – [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(Cl)(MP)]Fe(III) – [(tpe)(MP)]Fe(III).

Compuesto	CH ₃ -hemo (ppm)	α-CH ₂ (ppm)	H-meso (ppm)
[(Cl)(DP)]Fe(III)	53.48, 50.99	46.65	40.18, 38.11
[(tpe)(DP)]Fe(III)0	48.44, 47.00	43.03	38.26, 36.76
[(Cl)(MP)]Fe(III)	–	44.19, 42.99	37.91, 36.30
[(tpe)(MP)]Fe(III)	–	42.06, 40.31	37.17, 32.88

3.4 RPE

Se calcularon los valores de *g* a partir de los espectros de RPE a 90 K en banda X de [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) comparándolas con sus porfirinas precursoras como se muestra en la Figuras 38 y 39.

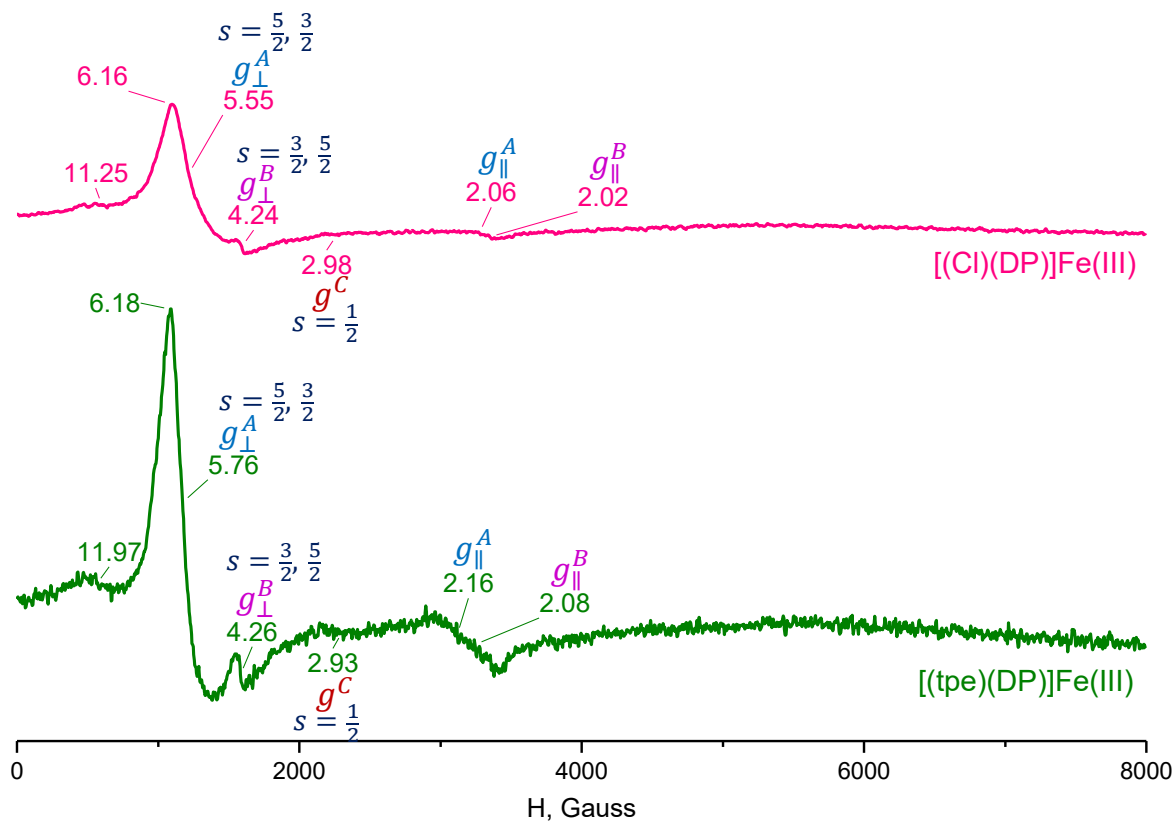


Figura 38 Espectros de RPE de los compuestos [(Cl)(DP)]Fe(III) - [(tpe)(DP)]Fe(III).

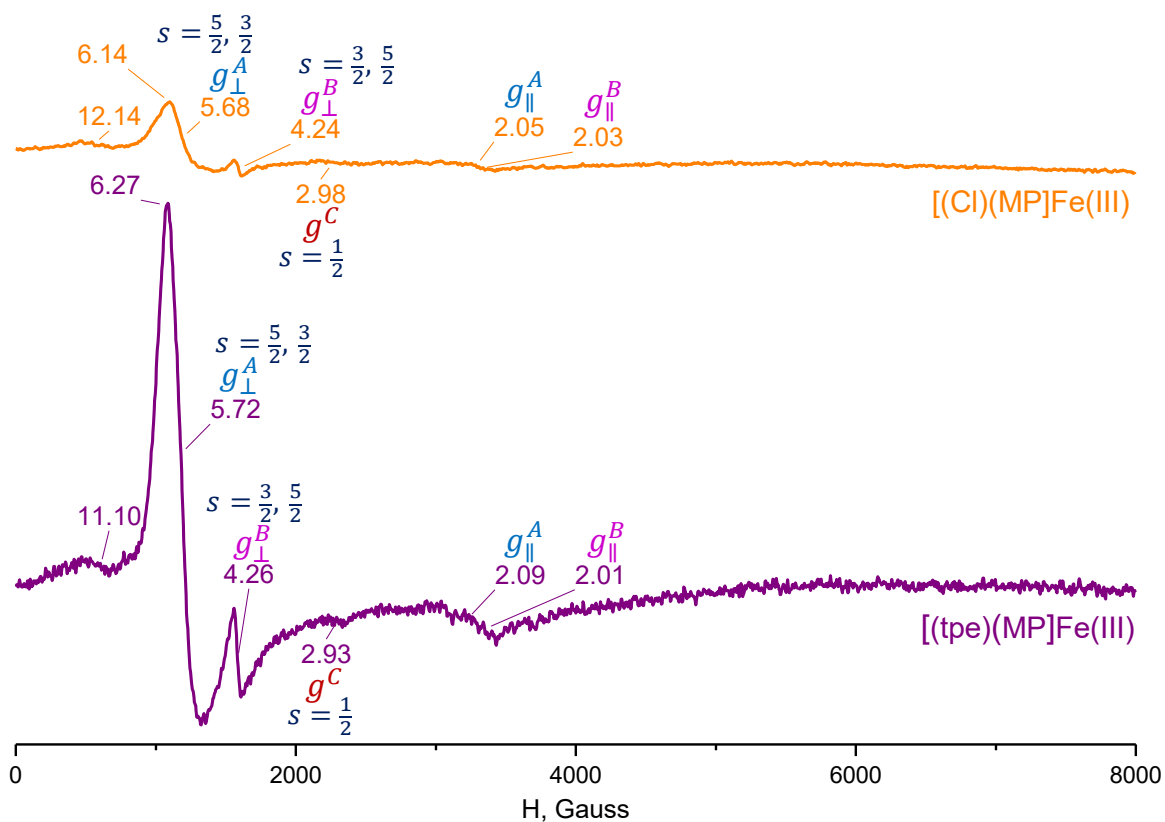


Figura 39 Espectros de RPE de los compuestos $[(Cl)(MP)]Fe(III)$ - $[(tpe)(MP)]Fe(III)$.

Los espectros de RPE presentan una simetría axial con pequeña rombicidad ya que los espectros tienen valores de g_{\perp} entre 6 y 4 y valores de g_{\parallel} alrededor de 2. Los valores de g_{\perp} entre 6 y 4 concuerdan a las especies de Fe(III) reportadas con mezcla cuántica de estados de espín $3/2, 5/2$ [Maltempo & Moss, 1976].

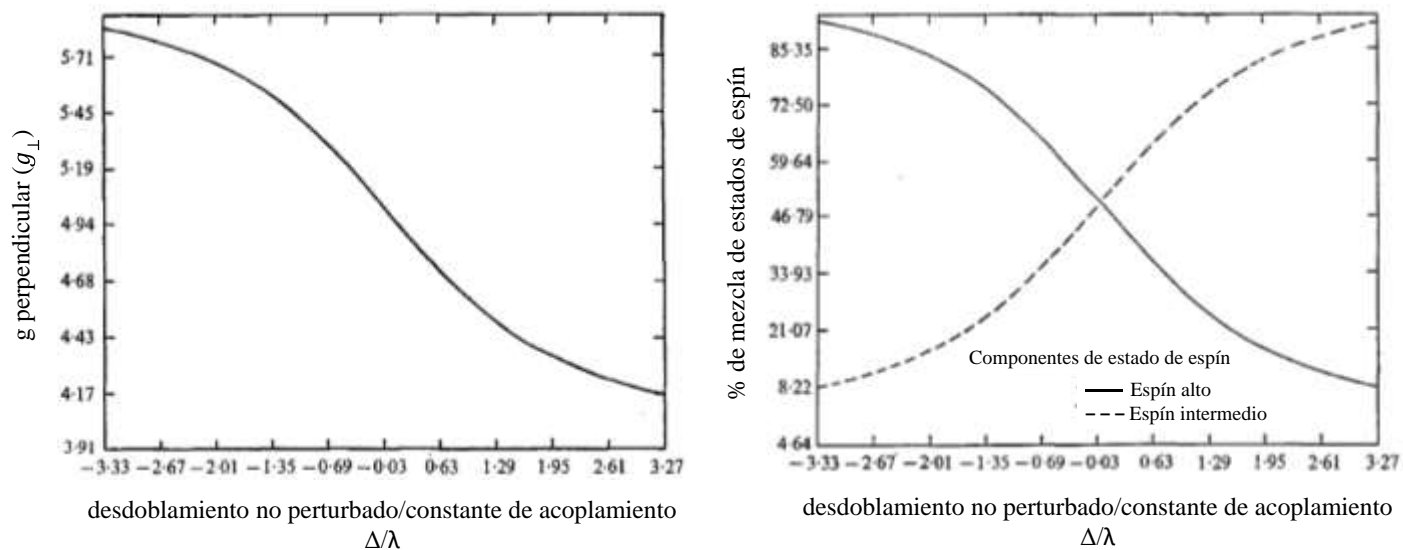


Figura 40 Gráficas de Maltempo y Moss.

Además, se calcularon los porcentajes de espín 3/2 y 5/2 en las especies cuánticamente mezcladas de acuerdo con las gráficas de Maltempo y Moss (Figura 40) [Maltempo & Moss, 1976], con los siguientes resultados (Figura 41 y 42):

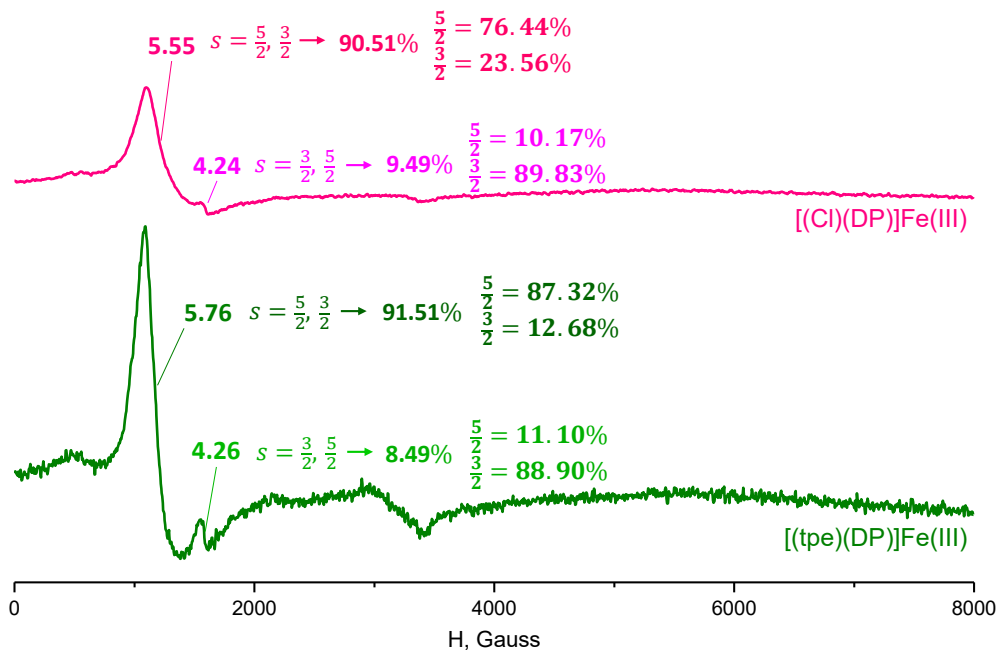


Figura 41 Porcentajes de espín de los compuestos $[(Cl)(DP)]Fe(III)$ - $[(tpe)(DP)]Fe(III)$.

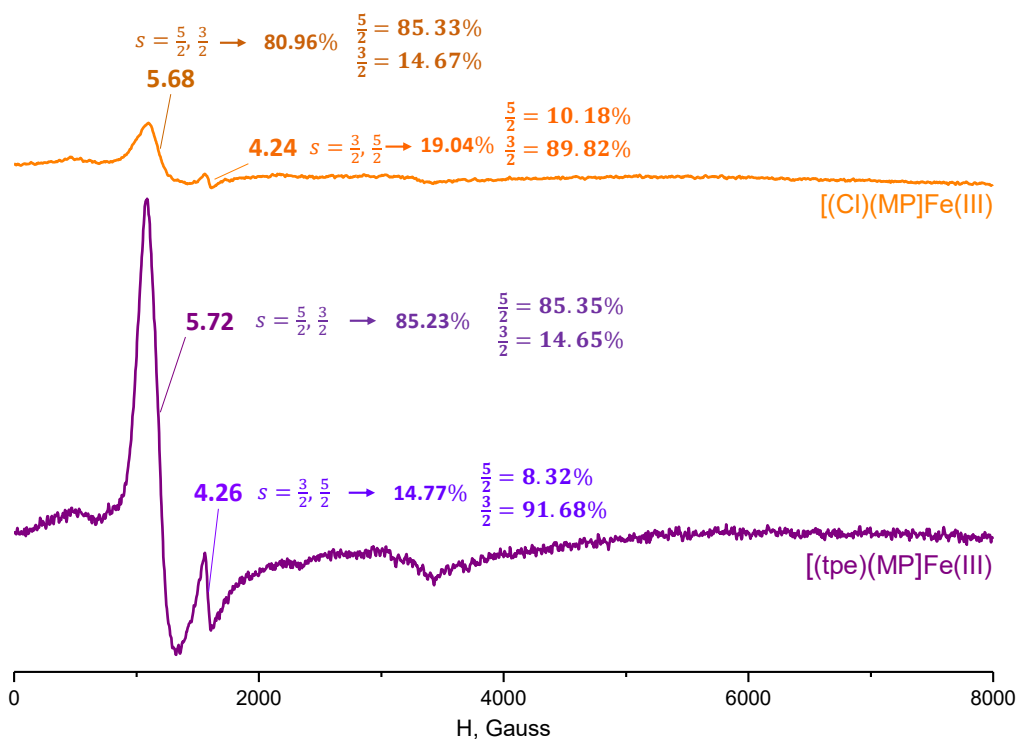


Figura 42 Porcentajes de espín de los compuestos $[(Cl)(MP)]Fe(III)$ - $[(tpe)(MP)]Fe(III)$.

La coordinación del ligante tpe aumenta el porcentaje de espín 5/2 en comparación con su

correspondiente porfirina precursora.

En la Tabla 32 se resumen los resultados de los porcentajes de ecm de las porfirinas iniciales y de los compuestos coordinados axialmente al tpe:

Tabla 32

Porcentaje de especie A y B calculados a partir de los espectros de RPE de los compuestos [(Cl)(DP)]Fe(III) – [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(Cl)(MP)]Fe(III) – [(tpe)(MP)]Fe(III).

Compuesto	Especies			
	A		B	
[(Cl)(DP)]Fe(III)	91%		9%	
	% s = 3/2	% s = 5/2	% s = 3/2	% s = 5/2
	23.56	76.44	89.83	10.17
[(tpe)(DP)]Fe(III)	92%		8%	
	% s = 3/2	% s = 5/2	% s = 3/2	% s = 5/2
	12.68	87.32	88.90	11.10
[(Cl)(MP)]Fe(III)	81%		19%	
	% s = 3/2	% s = 5/2	% s = 3/2	% s = 5/2
	14.67	85.33	89.82	10.18
[(tpe)(MP)]Fe(III)	85%		15%	
	% s = 3/2	% s = 5/2	% s = 3/2	% s = 5/2
	14.65	85.35	91.68	8.32

En la Tabla 33 se resumen los resultados de RPE de las porfirinas iniciales y de los compuestos coordinados axialmente al tpe [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III).

Tabla 33

Valores de *g* y porcentaje de especie A y B calculados a partir de los espectros de RPE de los compuestos [(Cl)(DP)]Fe(III) – [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(Cl)(MP)]Fe(III) – [(tpe)(MP)]Fe(III).

Compuesto	Especie A (5/2, 3/2)		Especie B (3/2, 5/2)		% Especie A	% Especie B	1/2 <i>g</i>
	<i>g</i>	<i>g</i> _⊥	<i>g</i>	<i>g</i> _⊥			
[(Cl)(DP)]Fe(III)	2.06	5.55	2.02	4.24	91	9	2.98
[(tpe)(DP)]Fe(III)	2.16	5.76	2.08	4.26	92	8	2.93
[(Cl)(MP)]Fe(III)	2.05	5.68	2.03	4.24	81	19	2.98
[(tpe)(MP)]Fe(III)	2.09	5.72	2.01	4.26	85	15	2.93

Finalmente, las contribuciones energéticas están contenidas en el siguiente Hamiltoniano (Ecuación 10):

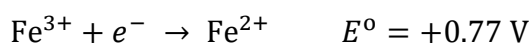
$$\hat{H} = \underbrace{\beta H \cdot g \cdot S}_{\textcircled{1}} + \underbrace{D \left[S_z^2 - \frac{1}{3} S(S+1) \right]}_{\textcircled{2}} + \underbrace{E (S_x^2 - S_y^2)}_{\textcircled{3}} \quad \text{(Ecuación 10)}$$

en donde, el término $\textcircled{1}$ corresponde a la del Zeeman electrónico, el término $\textcircled{2}$ al desdoblamiento de campo cero axial y el término $\textcircled{3}$ al desdoblamiento de campo cero rómbico. Además, β es el magnetón de Bohr, H es el campo magnético aplicada, g es el factor de desdoblamiento electrónico, S es el espín electrónico, D es el desdoblamiento de campo cero que surge de la distorsión axial de campo ligante y E es el desdoblamiento de campo cero que surge de la distorsión rómbica de campo ligante [Dowsing & Gibson, 1969; Pilbrow & Hanson, 1993].

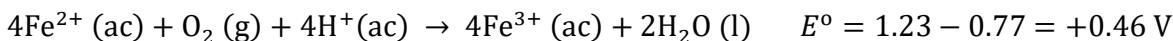
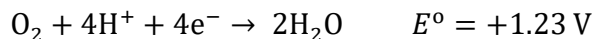
3.5 Prueba cualitativa como antioxidante

El radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) es usado para evaluar la capacidad de las sustancias de aceptar un electrón y correlacionarlo con la actividad antioxidante de diversas moléculas. El DPPH está caracterizado por una señal con una λ_{max} en 515 nm por UV-Vis característica de la transición electrónica del radical, dependiendo del disolvente, esta molécula fácilmente acepta un electrón o un protón para llegar a ser una molécula diamagnética [Kedare & Singh, 2011; Baca – Solis, 2016].

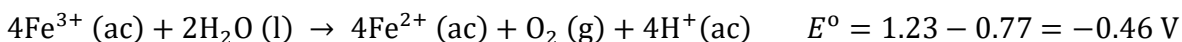
Los valores máximos de 29% para [(tpe)(DP)]Fe(III) y 21% para [(tpe)(MP)]Fe(III) obtenidos experimentalmente se deben a las condiciones aeróbicas de reacción. En condiciones normales la oxidación a Fe(III) es desfavorable [Whittemore & Langmuir, 1972]:



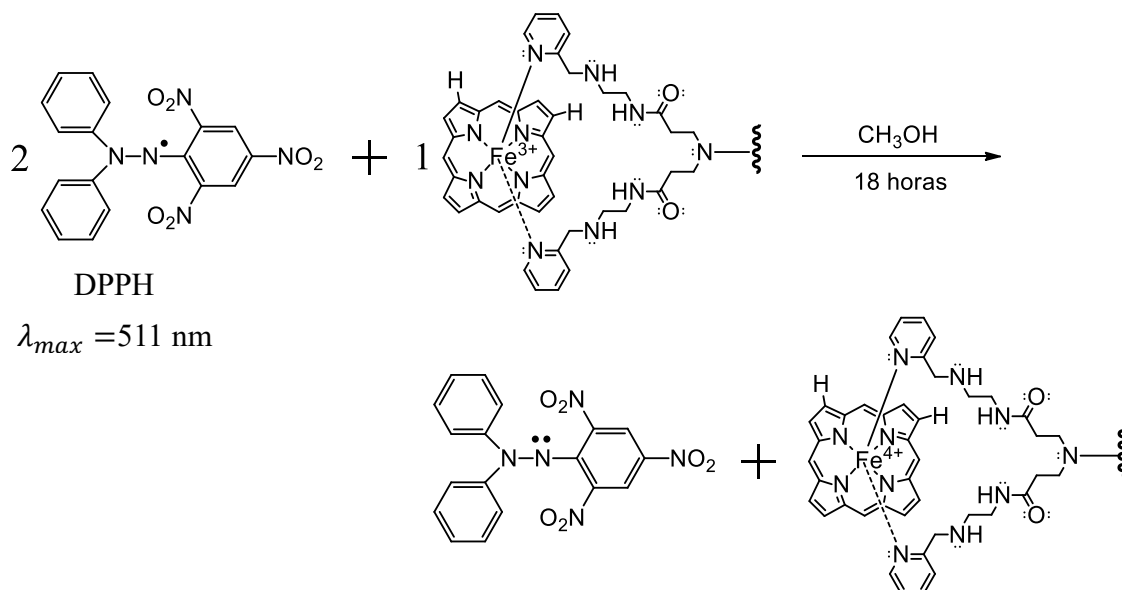
Sin embargo, la oxidación del Fe(II) a Fe(III) es favorable en presencia de oxígeno:



El potencial ($E^{\circ} = +0.46 \text{ V}$) de esta reacción muestra que la oxidación del Fe(II) a Fe(III) por el O_2 es espontánea [Shriver et al, 2014]. En nuestro caso la reacción que se lleva a cabo es en sentido contrario:



El potencial $E^{\circ} < 0$ y por lo tanto $\Delta G > 0$ de esta reacción muestra que la reducción de Fe(III) a Fe(II) por la presencia de O_2 es no espontánea [Shriver et al, 2014] (Esquema 4).



Esquema 4 Reacción general de $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ con DPPH.

3.6 Detección de la formación del radical π -catiónico ferrilo $[Por-Fe(IV)=O]^+$ por UV-Vis y RPE

Se hizo el seguimiento por UV-Vis de la reacción del compuesto $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ y $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ con H_2O_2 por 2 horas. Los espectros de UV-Vis muestran un punto isobéptico debido a que están en equilibrio las especies $Fe^{3+} - Fe^{4+}$. La disminución de la banda Soret hasta su desaparición debido al rompimiento del anillo de porfirina y el desplazamiento de las bandas Q indica de la formación del Compuesto I (radical π -catiónico ferrilo) [Wariishi & Gold, 1990], como se muestra en las Figuras 23 y Figuras 24.

Además, se confirmó la formación del compuesto I por RPE debido a la aparición de una señal del radical con $g = 1.99$ y un espectro axial con un valor de $g = 4.24$ que aumenta y que corresponde a un $s = 3/2$. Ambas señales corresponden a la formación del compuesto I ($\{[(tpe)(DP)]Fe(IV)=O\}^+$ y $\{[(tpe)(MP)]Fe(IV)=O\}^+$). Los espectros de RPE muestran un aumento en la proporción de $s = 3/2$ en las especies con ecm cuando se forma el $Fe(IV)$ en comparación con sus porfirinas precursoras [Hernández – Anzaldo *et al*, 2016] (Figuras 43 y 44).

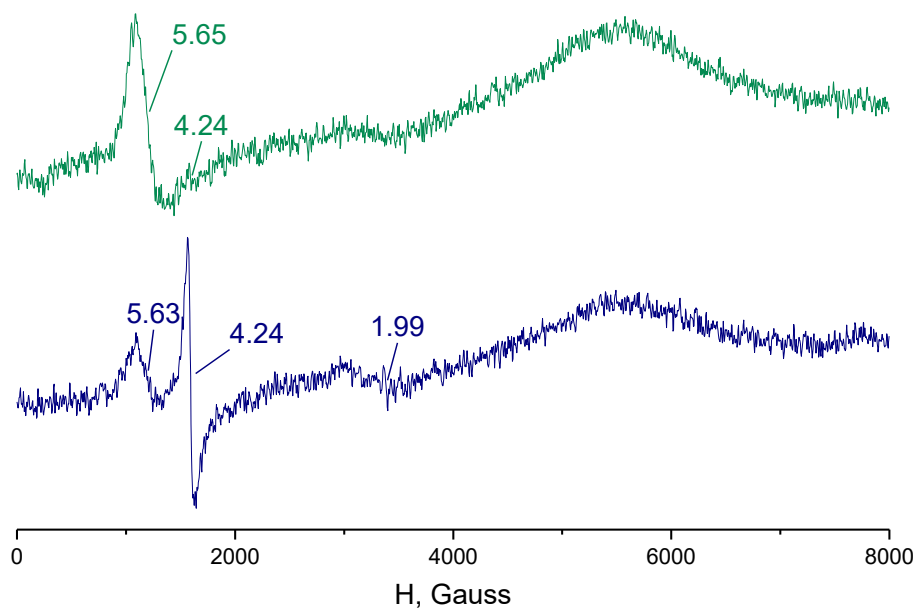
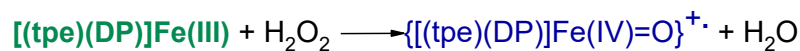


Figura 43 Espectro axial de RPE de $\{[(\text{tpe})(\text{DP})\text{Fe}(\text{IV})=\text{O}]^+\}$.

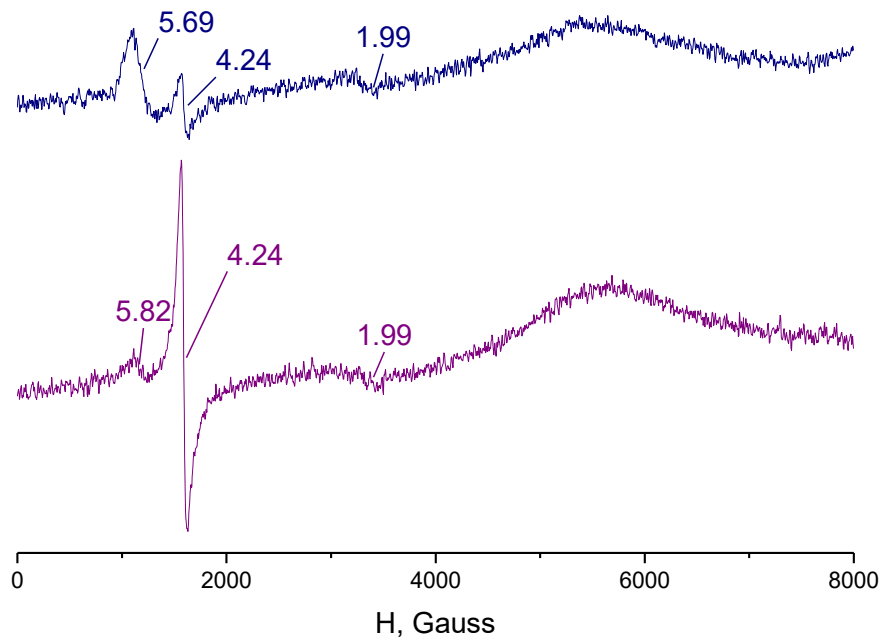
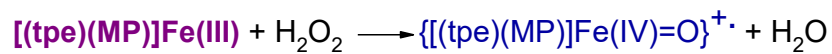
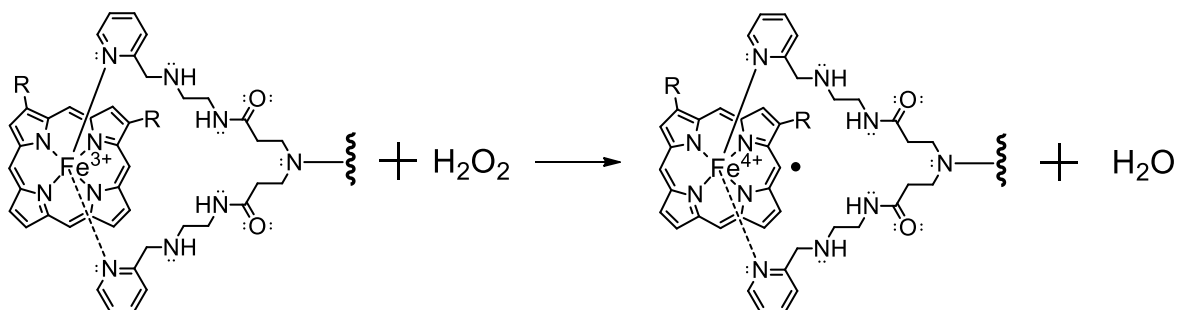


Figura 44 Espectro axial de RPE de $\{[(\text{tpe})(\text{MP})\text{Fe}(\text{IV})=\text{O}]^+\}$.

Por lo tanto, con base en los espectros de UV-Vis y RPE se propone la siguiente reacción (Esquema 5):



Esquema 5 Reacción general de [(tpe)(DP)]Fe(III) con H₂O₂.

3.7 Cuantificación de K_M y de k_{cat}

En este trabajo se utiliza la siguiente ecuación para analizar los datos de velocidad inicial (v_i):

$$\frac{[(\text{tpe})(\text{Porfirina})]\text{Fe(III)}]_0}{v_0} = \frac{K_{\text{H}_2\text{O}_2}}{k_{cat}} \frac{1}{[\text{H}_2\text{O}_2]} + \frac{1}{k_{cat}} \left(1 + \frac{K_{\text{Guayacol}}}{[\text{Guayacol}]} \right) \quad (\text{Ecuación 11})$$

donde $[(\text{tpe})(\text{Porfirina})]\text{Fe(III)}]_0$ es la concentración de los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) total, v_i es la velocidad inicial, $K_{\text{H}_2\text{O}_2}$ y K_{Guayacol} son las constantes de Michaelis, y k_{cat} es la constante de velocidad teórica máxima. Si $[\text{Guayacol}]$ se mantiene constante, entonces una gráfica de $[(\text{tpe})(\text{Porfirina})]\text{Fe(III)}]_0/v_i$ contra $1/[\text{H}_2\text{O}_2]$ es una línea recta y para un nuevo valor de $[\text{Guayacol}]$ es obtenida una línea recta paralela. Así, la cinética de ping-pong es conocida como cinéticas de líneas paralelas. Las gráficas obtenidas usando la Ecuación 11 son llamadas gráficas primarias [Dunford, 1991] (Figura 45 y 46).

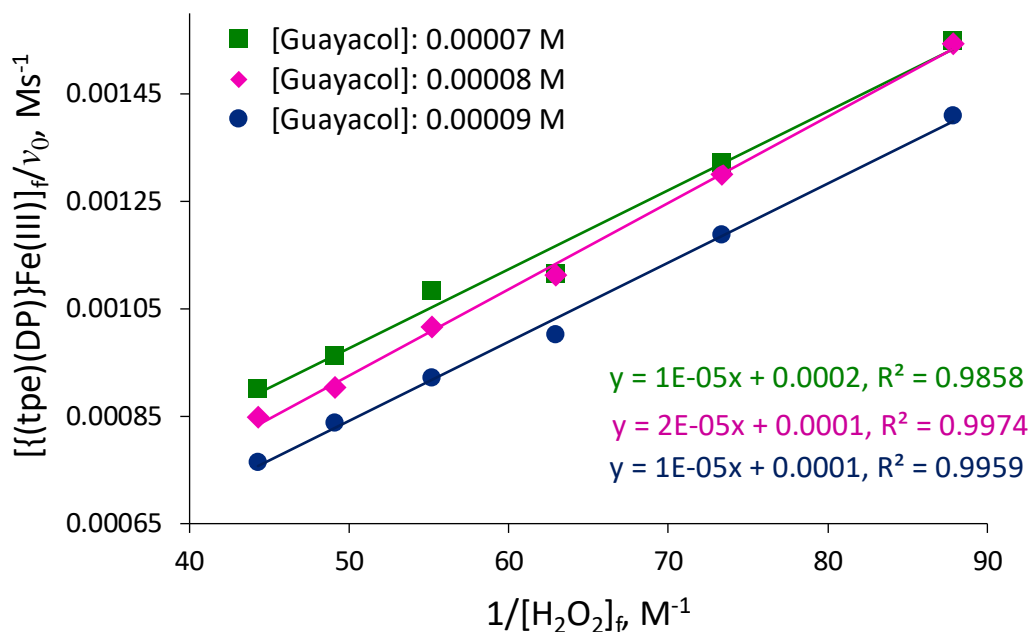


Figura 45 Gráfica primaria para el compuesto [(tpe)(DP)]Fe(III), n = 9–10.

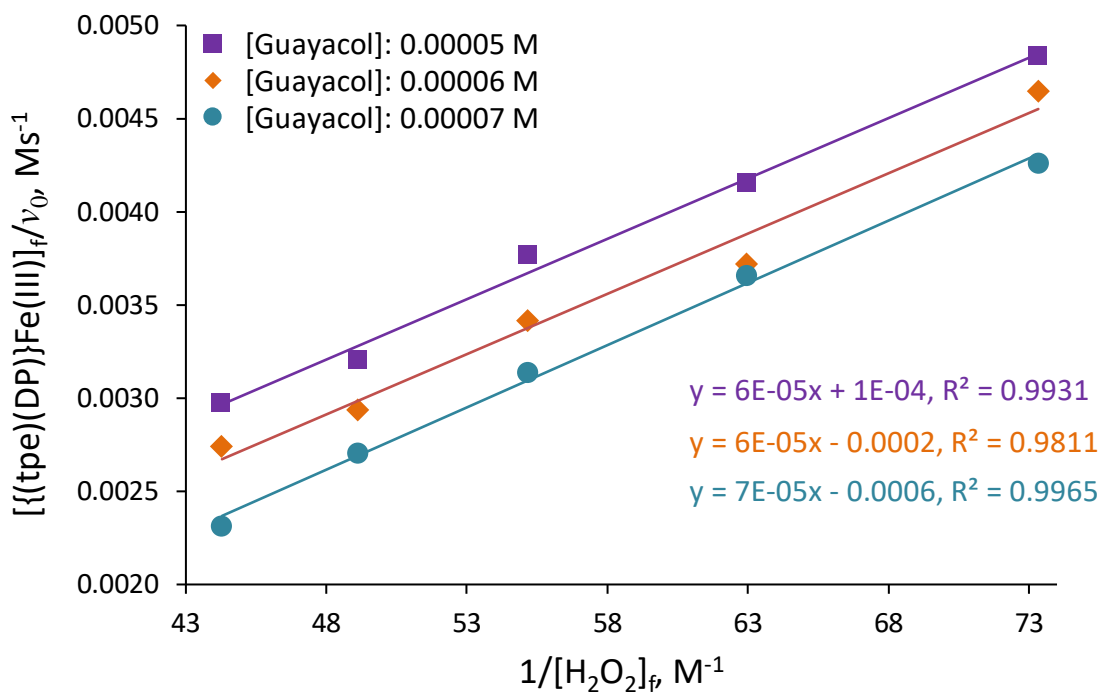


Figura 46 Gráfica primaria para el compuesto [(tpe)(MP)]Fe(III), n = 9–10.

Las intersecciones al eje y de estas líneas rectas paralelas son dadas por

$$\text{Intercecto primario} = \frac{K_{H_2O_2}}{k_{cat}} \frac{1}{[H_2O_2]} + \frac{1}{k_{cat}} \quad (\text{Ecuación 12})$$

La gráfica obtenida usando la Ecuación 12 es llamada gráfica secundaria (Figura 47 y 48).

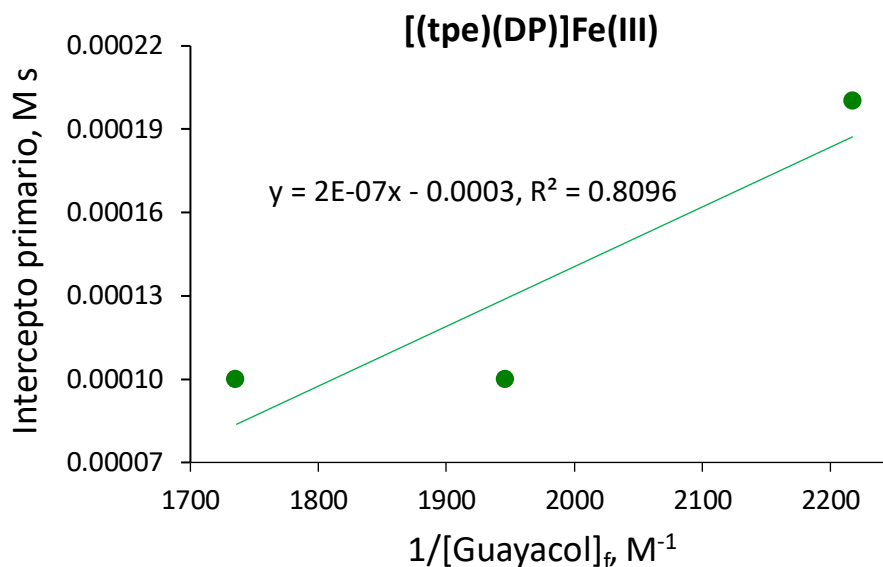


Figura 47 Gráfica secundaria para el compuesto [(tpe)(DP)]Fe(III).

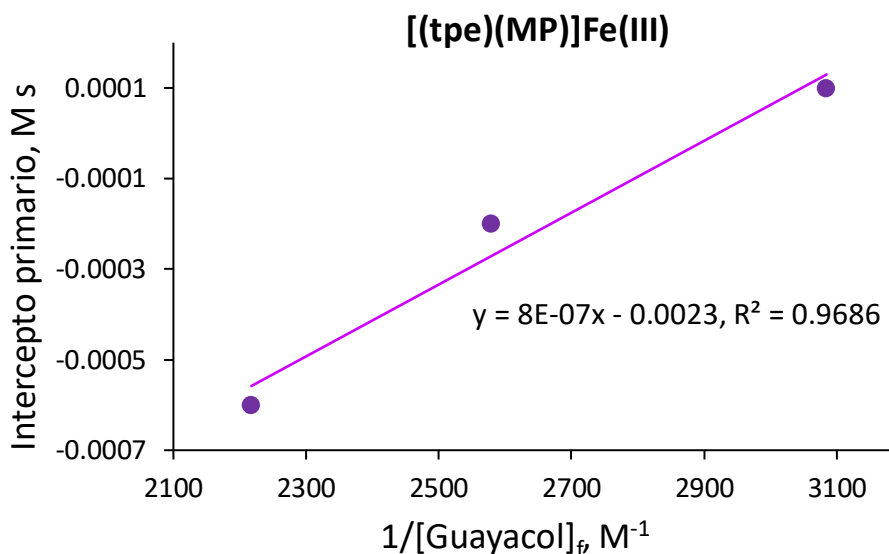


Figura 48 Gráfica secundaria para el compuesto [(tpe)(MP)]Fe(III).

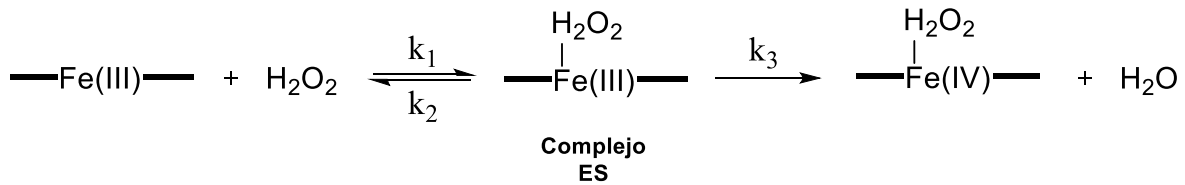
A partir de los valores de intercepto primario de la gráfica secundaria obtenidos de la Ecuación 11 contra $1/[\text{Guayacol}]$, k_{cat} y $K_{H_2O_2}$ pueden ser calculados (Ecuación 12). Por lo tanto, usando el valor de k_{cat} , K_{Guayacol} puede ser obtenido de las pendientes paralelas obtenidas usando la Ecuación 11 [Dunford, 1991]. En la Tabla 34 se presentan los valores obtenidos para los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III).

Tabla 34

Constantes de Michaelis – Menten y velocidad máxima teórica de los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III).

Compuesto	$K_{H_2O_2}$ M	$K_{Guayacol}$ M	k_{cat} M ⁻¹ s ⁻¹
[(tpe)(DP)]Fe(III)	4.44×10^{-2}	6.67×10^{-4}	3.333×10^3
[(tpe)(MP)]Fe(III)	2.75×10^{-2}	3.48×10^{-4}	4.34×10^2

Los valores obtenidos de $K_{H_2O_2}$ para los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) (Tabla 34) indican una baja afinidad por el H_2O_2 . Con base en lo propuesto por Reyes – Ortega, las constantes de disociación del complejo ES (enzima – sustrato) son iguales a $K_{H_2O_2}$ si k_2 es mucho más pequeña que k_3 , $K_{H_2O_2}$ es una medida de la fuerza del complejo ES, en este caso $k_2 \ll k_3$ y $K_{H_2O_2}$, implica que el equilibrio se desplaza hacia la izquierda, es decir, a la formación del H_2O_2 (Esquema 6) [Reyes – Ortega, 1998].

**Esquema 6** Paso limitante de la velocidad de reacción.

El mecanismo de reacción de las peroxidasas propone la coordinación del H_2O_2 al Fe(III), en los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) debe descoordinarse uno de los piridilos para permitir la coordinación del H_2O_2 al metal, de acuerdo con el mecanismo propuesto por Reyes – Ortega [Reyes – Ortega, 1998].

Los valores de $K_{Guayacol}$ de los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) son más pequeños que los de $K_{H_2O_2}$. Esto concuerda con el mecanismo propuesto de la HRP, en donde una vez que la enzima es oxidada, esta oxida inmediatamente al otro sustrato (guayacol).

En la Tabla 35 se muestran los valores de $K_{H_2O_2}$, $K_{Guayacol}$ y k_{cat} de algunos compuestos de coordinación de la familia porfirina – pinza. Los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) muestran una actividad catalítica menor que los respectivos compuestos [(picdien)(DP)]Fe(III) y [(picdien)(MP)]Fe(III), por lo menos en un orden de magnitud.

Tabla 35

Constantes de Michaelis – Menten y velocidad máxima teórica de diferentes compuestos.

Compuesto	$K_{H_2O_2}$ M	$K_{Guayacol}$ M	k_{cat} $M^{-1}s^{-1}$	Especie A	Especie B
				$s = \frac{3}{2}, \frac{5}{2}$	$s = \frac{3}{2}, \frac{5}{2}$
[(Cl)(DP)]Fe(III) ^a	2.87×10^{-1}	1.62×10^{-4}	3.93×10^3	90.51% [23.6%, 76.4%]	9.49% [89.8%, 10.2%]
[(tpe)(DP)]Fe(III)^b	4.44×10^{-2}	6.67×10^{-4}	3.333×10^3	91.5% [12.7%, 87.3%]	8.5% [88.9%, 11.1%]
[(picdien)(DP)]Fe(III) ^a	1×10^{-1}	3.54×10^{-4}	9.05×10^4	86% [47%, 53%]	14% [7%, 93%]
[(picocta)(DP)]Fe(III) ^c	1.65×10^{-2}	3.36×10^{-4}	3.58×10^2	79.27% [8.2%, 91.8%]	20.73% [88.6%, 11.4%]
[(picpenta)(DP)]Fe(III) ^d	1.3×10^{-1}	4.3×10^{-4}	1.9×10^2	90% [24%, 76%]	10% [85%, 15%]
[(picdipropilen)(DP)]Fe(III) ^e	4.16×10^{-2}	1.17×10^{-4}	3.15×10^2	>70% [29%, 71%]	<30% [86%, 14%]
[(Cl)(MP)]Fe(III) ^a	1.22×10^{-2}	9.11×10^{-5}	1.67×10^3	81% [14.7%, 85.3%]	19% [89.8%, 10.2%]
[(tpe)(MP)]Fe(III)^b	2.75×10^{-2}	3.48×10^{-4}	4.34×10^2	85.2% [14.7%, 85.3%]	14.8% [91.7%, 8.3%]
[(picdien)(MP)]Fe(III) ^a	8.57×10^{-2}	7.59×10^{-4}	4.37×10^5	64% [36%, 64%]	36% [92%, 8%]
[(picocta)(MP)]Fe(III) ^c	3.03×10^{-2}	3.05×10^{-5}	1.90×10^2	67.27% [8.2%, 91.8%]	32.73% [67.3%, 32.7%]
[(picpenta)(MP)]Fe(III) ^d	4.2×10^{-1}	5.3×10^{-4}	1.5×10^3	90% [16%, 84%]	10% [85%, 15%]
[(picdipropilen)(MP)]Fe(III) ^e	2.49×10^{-2}	1.36×10^{-4}	2.7×10^2	>70% [15%, 85%]	<30% [86%, 14%]
[(picdien)(PP)]Fe(III) ^a	9.10×10^{-2}	2.29×10^{-3}	7.62×10^6	23% [56%, 44%]	77% [<8%, >92%]
HRP ^f	1.3×10^{-1}	—	1.78×10^7	—	—

a [Reyes — Ortega et al, 1998]

b Este trabajo

c [Arroyo — Abad, 2007]

d [León — García, 2005]

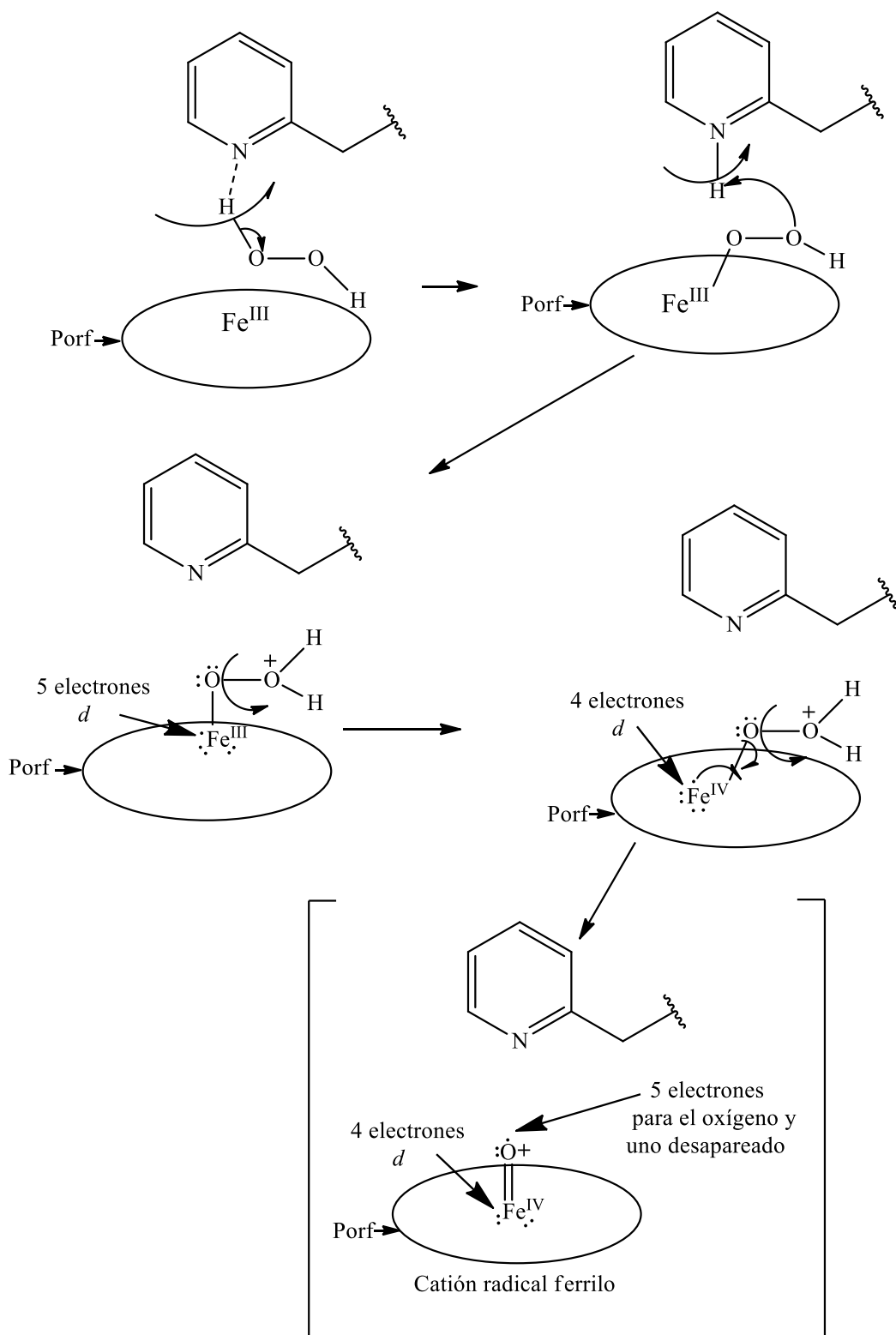
e [Sánchez — Sandoval, 2003]

f [Dolman et al, 1975]

Con base en los estudios cinéticos se propone que el mecanismo de reacción entre [(tpe)(DP)]Fe(III) ó [(tpe)(MP)]Fe(III), H₂O₂ y guayacol es un mecanismo del tipo ping-pong, similar al observado para la HRP. Implica primeramente la formación del Compuesto I que posteriormente se transformara en Compuesto II por reducción de un electrón y

finalmente se reduce el Compuesto II para obtener los compuestos de partida [(tpe)(DP)]Fe(III) o [(tpe)(MP)]Fe(III).

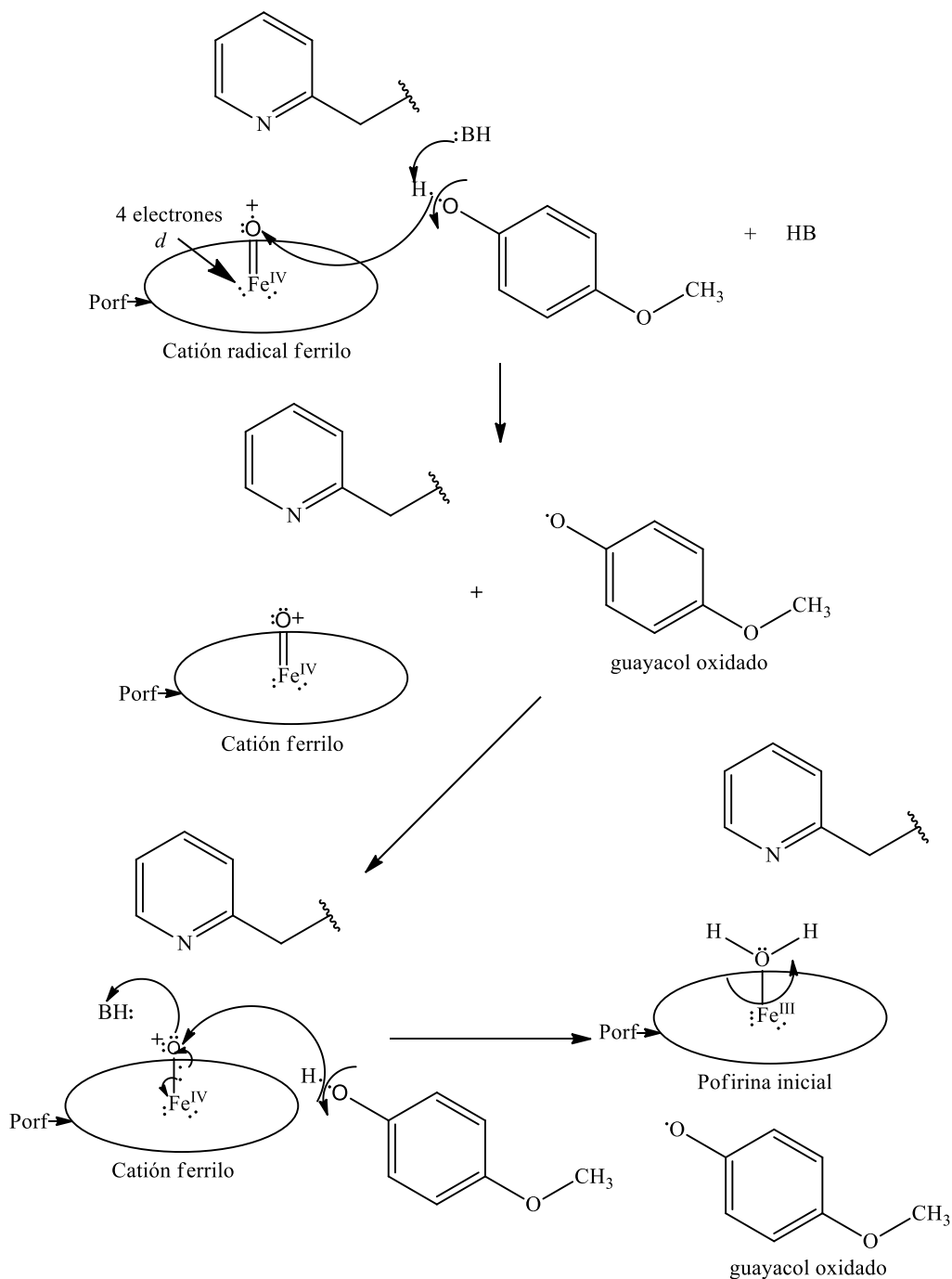
El mecanismo comienza cuando el N de uno de los grupos piridilo del tpe se descoordina del Fe(III) permitiendo que reaccione con el H₂O₂. Uno de los H del H₂O₂ se enlaza al N del piridilo, provocando que el enlace H-O se rompa heterolíticamente. La formación del intermediario Fe(III)-O-O-H involucra un flujo electrónico desde el piridilo hacia el Fe(III). Un O del intermediario Fe(III)-O-O-H, ataca al H del piridilo. Una molécula de H₂O se desplaza como un buen grupo saliente provocando la ruptura O-O, el flujo electrónico va desde el Fe(III) hacia el piridilo. El O y el Fe forman un doble enlace produciendo el catión radical ferrilo o Compuesto I (Esquema 7).



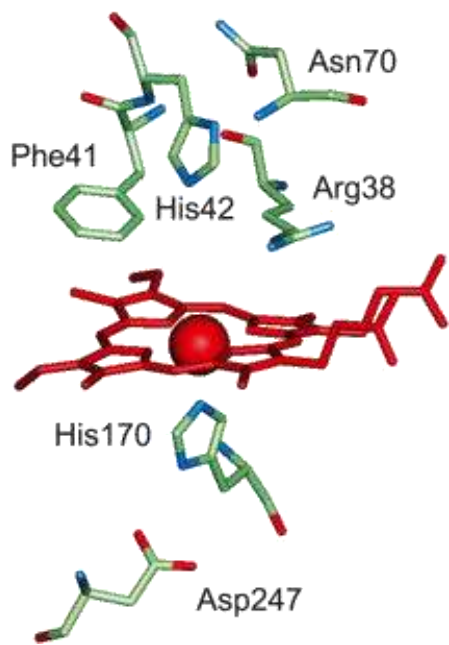
Esquema 7 Mecanismo propuesto para la formación del Compuesto I.

El Compuesto I reacciona con un equivalente de guayacol. Un grupo básico reacciona con el guayacol desprotonándolo y éste dona un electrón al O del grupo ferrilo de la porfirina,

formándose el catión radical ferrilo o Compuesto II 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 (H_2O), reducir el Fe(IV) a Fe(III) para formar $[(\text{tpe})(\text{DP})]\text{Fe(III)}$ ó $[(\text{tpe})(\text{MP})]\text{Fe(III)}$ y obtener los POG debido a la dimerización del guayacol oxidado (Esquema 8).



Esquema 8 Mecanismo propuesto para la reducción del Compuesto II a $[(\text{picdien})(\text{DP})]\text{Fe(III)}$ y $[(\text{picdien})(\text{MP})]\text{Fe(III)}$.



CAPITULO 4

Conclusiones

4.1 Conclusiones

4.1 Conclusiones

- Se sintetizaron dos nuevos compuestos modelo de porfirina–pinza [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) utilizando como ligantes la deuteroporfirina, la mesoporfirina y el tpe.
- La caracterización espectroscópica por UV-Vis, IR, RMN-¹H y RPE y los resultados cinéticos de los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) contribuyeron a la propuesta de sus estructuras probables puesto que estos compuestos se obtuvieron en disolución y no hay posibilidad de obtener polvos o un monocristal que pueda ser estudiado por cristalografía de Rayos-X.
- Los estudios de RPE arrojaron para los dos compuestos reportados dos especies de Fe(III) con ecm, $s = 3/2$, $s = 5/2$, siendo la de mayor proporción las especies que contiene mayor $s = 5/2$ sobre $s = 3/2$.
- La actividad de [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) como peroxidasa fue desfavorecida por el mayor porcentaje de las especies de ecm con mayor proporción del espín $5/2$ en la mezcla cuántica de espín, $s = 5/2, 3/2$.
- Se determinó cualitativamente que los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) pueden funcionar como antioxidantes.
- Los valores obtenidos de $k_{cat} = 3.333 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para [(tpe)(DP)]Fe(III) y $k_{cat} = 4.34 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para [(tpe)(MP)]Fe(III) son bajos con respecto a la HRP ($1.78 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), pero son útiles como modelos espectroscópicos y cinéticos aproximados de HRP. El ligante tpe desfavorece la actividad del compuesto [(tpe)(MP)]Fe(III) en un orden de magnitud. El compuesto porfirina–pinza [(tpe)(DP)]Fe(III) tiene la misma actividad que su porfirina precursora [(Cl)(DP)]Fe(III). La pinza utilizada no modificó la actividad catalítica.
- Los compuestos [(tpe)(DP)]Fe(III) y [(tpe)(MP)]Fe(III) son potenciales catalizadores de reacciones de oxidación de dobles enlaces o de compuestos hidrocarbonados con carbonos terciarios.

Bibliografía

Adar, F.; Dolphin, D.; *The popyhrins: Volume III (Physical Chemistry, Part A)*; Ed. Academic Press: EUA, **1978**, 171.

Arroyo – Abad, U.; *Estudios cinéticos de los complejos: [(picocta)(cloroproto-, cloromeso-, clorodeuteroporfirinadimetiléster)]Fe(III) como modelos de enzimas peroxidasa*; Tesis de maestría; BUAP; **2007**.

Atkins, P; Overton, T.; Rourke, J.; Weller, M.; Armstrong, F.; Hagerman, M; *Inorganic Chemistry*; Ed. Oxford University Press: EUA; **2010**, 228.

Baca – Solis, E.; Flores – Alamo, M.; Ramírez – Rosales, D.; Zamorano – Ulloa, R.; Hernández – Anzaldo, S.; Reyes – Ortega, Y; *J. Anal. Bioanal. Tech.*; **2016**, 7, 3.

Berglund, G. I.; Carlsson, G. H.; Smith, A. T.; Szöke, H.; Henriksen, A.; Hajdu, J; *Nature*; **2002**, 417, 464.

Boelsterli, U. A; *Drug-induced liver disease*; Ed. Academic Press: EUA, **2013**, 346.

Boersma A.; Goff, H. M.; *Inorganic Chemistry*; **1982**, 21, 581–586.

Bohinski, R. C.; *Bioquímica*; Ed. Adison Wesley Iberoamericana, **1987**; 179 – 188.

Budd, D. L.; La Mar, G. N.; Langry, K. C.; Smith, K. M.; Nayyir – Mazhir, R.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1979**, 101:20, 6096.

Cervantes – Mejía, V.; Baca – Solis, E.; Caballero – Jiménez, J.; Merino – García, R.; Cruz – Gatica, J.; Moreno – Martínez, G.; Reyes – Ortega, Y.; *American Journal of Analytical Chemistry*; **2014**, 5, 1090-1101.

Chang, R.; *Fisicoquímica*; Ed. McGraw-Hill Interamericana: España, **2008**, 548.

Dawson, J. H.; *Science*; **1988**, 240, 433-439.

Drago, R. S.; *Physical methods for chemists*; Ed. Surfside Scientific Publishers: EUA, **1992**.

De Jesus, E.; Flores, J. C.; *Ind. Eng. Chem. Res.*; **2008**, 47, 7968-7981.

Dolman, D.; Newell, G. A.; Thurlow, M. D.; Dunford, H. B.; *Can. J. Biochem.*; **1975**, 53, 495 – 501.

Dowsing, R. D.; Gibson, J. F.; *J. Chem. Phys.*; **1969**, 50, 294.

Dunford, H. B.; *Peroxidases in Chemistry and Biology: Volume II*; Ed. CRC Press: EUA, **1991**, 3 – 6.

Gouterman, M.; Dolphin, D.; *The porphyrins: Volume III (Physical Chemistry, Part A)*; Ed. Academic Press: EUA, **1978**, 11-13.

Grayson, S. M.; Fréchet, J. M.; *J. Chem. Rev.*; **2001**, *101*, 3819-3867.

Hernández – Anzaldo, S.; Arroyo – Abad, U.; León – García, A.; Ramírez – Rosales, D.; Zamorano – Ulloa, R.; Reyes – Ortega, Y.; *Molecules*; **2016**, *21*, 804.

Huheey, J.; Keiter, E.; Keiter, R.; *Química Inorgánica*; Ed. Alfaomega: México, **2007**.

Kedare, S. B.; Singh, R. P.; *J. Food Sci. Technol.*; **2011**, *48*, 412 – 422.

Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R.; *The Porphyrin Handbook: Vol. III*; Ed. Academic Press: USA, **2000**, 3.

Klajnert, B.; Bryszewska, M.; *Acta Bioquím. Pol.*; **2001**, *48*, 199 – 208.

Knecht, M. R.; Weir, M. G.; Myes, V. S.; Pyrz, W. D.; Ye, H.; Petkov, V.; Buttrey, D. J.; Frenkel, A. I.; Crooks, R. M. *Chem. Mater*; **2008**, *20*, 5218 – 5228.

Kwon, T. W.; Alam, M. M.; Jenekhe, S. A.; *Chem. Matter* **2004**, *16*, 4657 – 4666.

León – García, A.; *Estudios cinéticos de los complejos [(picpenta)(mesopofirinato-dimetiléster)]Fe(III) y [(picpenta)(deuteropofirinato-dimetiléster)]Fe(III) como modelos de enzimas peroxidasa*; Tesis de maestría; BUAP; **2005**.

Mabbs, F. E.; *Chemical Society Reviews*; **1993**, 313 – 324.

Maltempo, M. M.; Moss, T. H.; *Q. Rev. Biophys.*; **1976**, *9*, 181 – 215.

Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Lehninger: Principios de Bioquímica*; Ed. Ediciones Omega: España, **2009**, 186 – 205.

Owens, J. W.; O'Connor, C. J.; *Coordination Chemistry Reviews*; **1988**, *84*, 5 – 7.

Patil, M. L.; Zhang, M.; Taratula, O.; Garbuzenko, O. B.; He, H.; Minko, T.; *Biomacromolecules*; **2009**, *10*, 258-266.

Pilbrow, J. R.; Hanson, G. R.; *Methods in enzymology*; **1993**, *227*, 330 – 337.

Pretsch, E; Buhlmann, P.; Badertscher, M.; Structure determination of organic compounds; Ed Springer, 2009, 269 — 335.

Reyes – Ortega, Y.; Alvarez – Toledano, C.; Ramírez – Rosales, D.; Sánchez – Sandoval, A; Gonzáles – Vergara, E.; Zamorano – Ulloa, R.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*; **1998**, 667 – 674.

Rorabacher, D.B.; *Anal. Chem.*; **1991**; 63, 139 – 146.

Sánchez – Sandoval, A; Alvarez – Toledano, C.; Gutierrez – Perez, R.; Reyes – Ortega, Y.; *Synthetic. Comm.*; **2003**, 33, 48.

Shriver, D.; Weller, M.; Overton, T.; Rourke, J.; Armstrong, F.; Inorganic Chemistry; 6ta edición; Ed. W. H. Freeman and Company: EUA, **2014**, 167.

Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. M.; Crouch, S. R.; *Fundamentos de Química Analítica*; Ed. Thomson: México, **2005**, 170, 171.

Veitch, C. N.; *Phytochemistry*; **2004**, 65, 249.

Wariishi, H.; Gold, M. H.; *The Journal of Biological Chemistry*; **1990**, 265, 2070 – 2077.

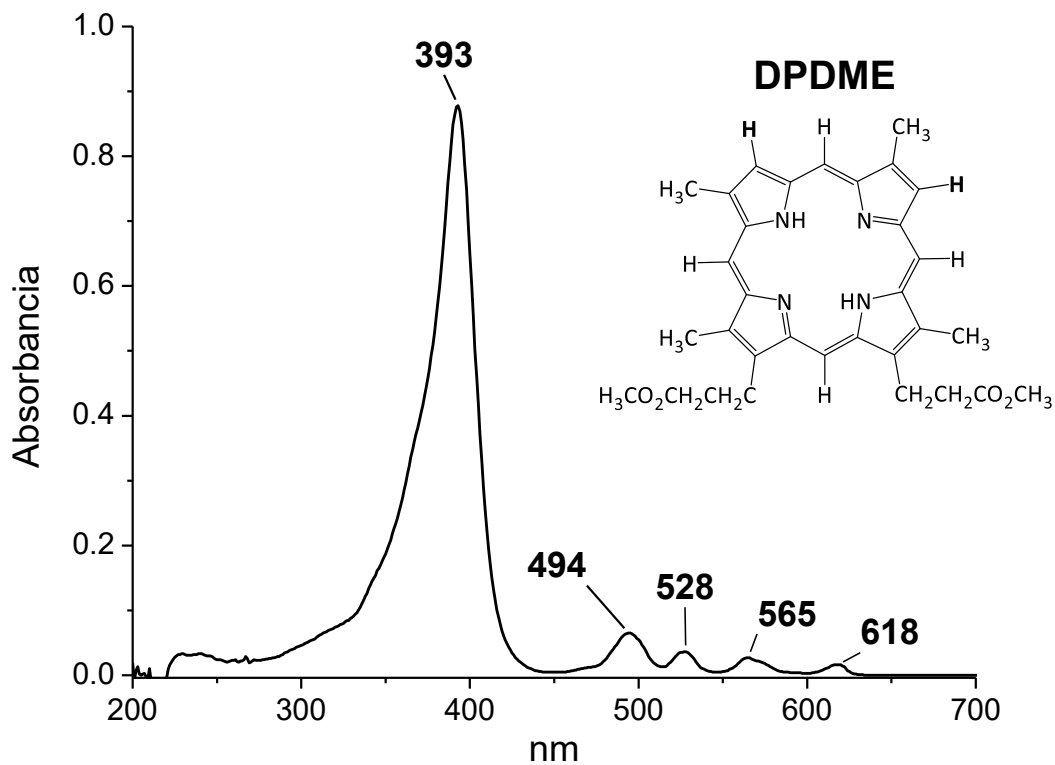
Wei-Shi, L.; Takuzo, A.; *Chem. Rev*; **2009**, 109, 6047 – 6076.

Whittemore, D. O.; Langmuir, D.; *Journal of Chemical and Engineering Data*; **1972**, 17, 288 – 290.

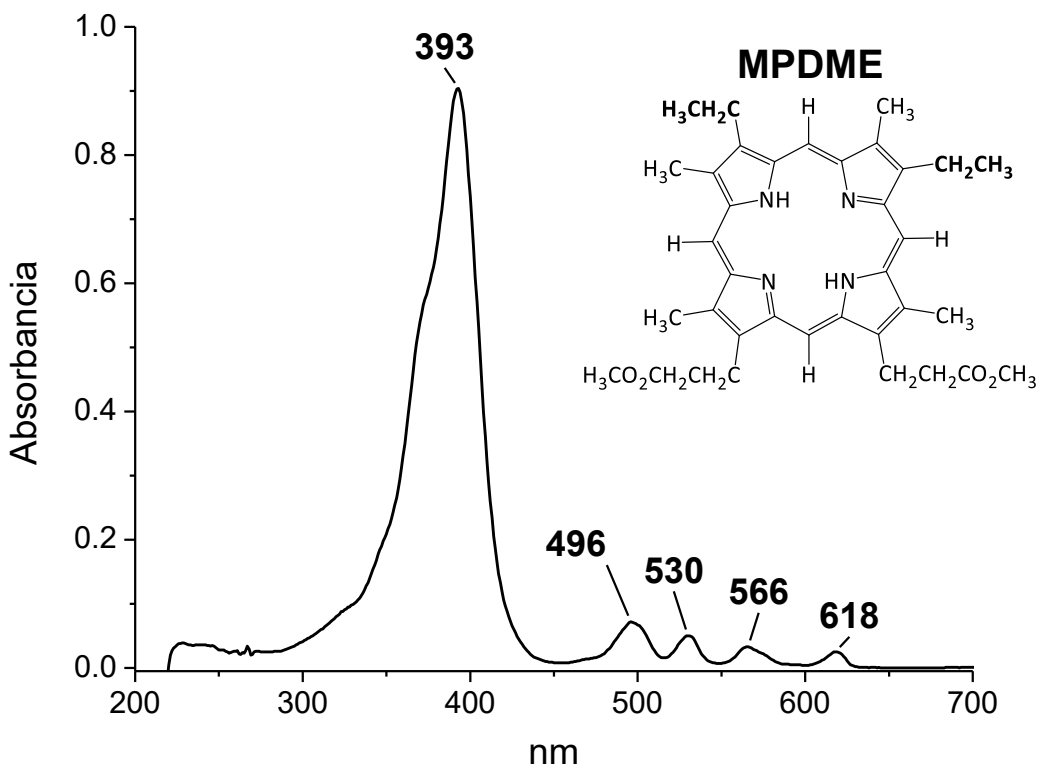
Zerner, M.; Gouterman, M.; Kobayashi, H.; *Theoret. chim. Acta*; **1966**, 6, 363 – 400.

Apendice I

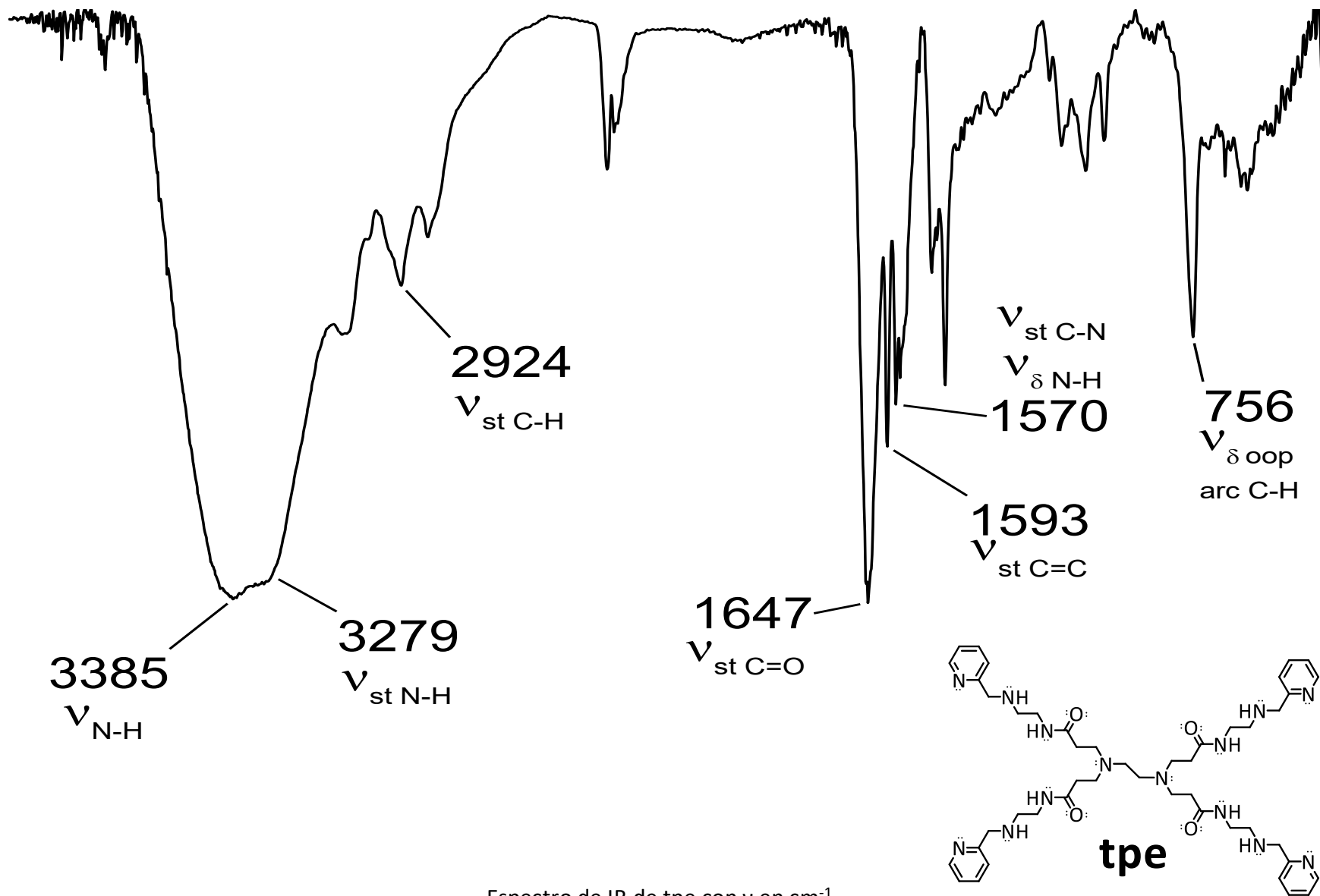
Espectros de UV-Vis, IR, RMN-¹H Y RPE



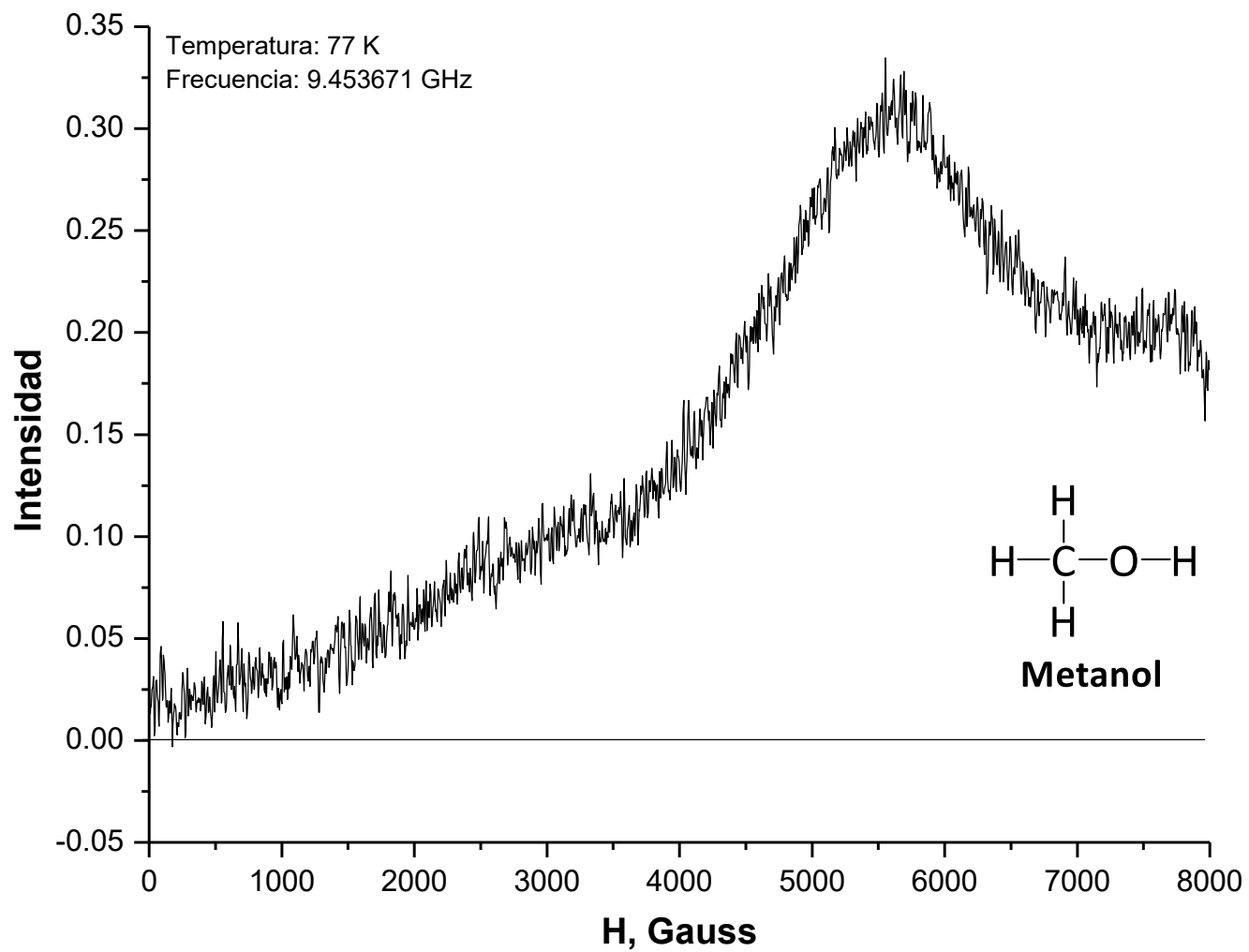
Espectro de UV-Vis de DPDME (Deuteroporphiradimetiléster).



Espectro de UV-Vis de MPDME (Mesoporphiradimetiléster).



Espectro de IR de tpe con ν en cm^{-1} .



Espectro de RPE de metanol.

Apendice II

Tablas de datos cinéticos

Tabla 4

Comportamiento Michaelis – Menten. Variación de [(tpe)(DP)]Fe(III) con [H₂O₂] y [Guayacol] constantes.

mL	Abs	[tpeDPFe(III)], mM	v₀, s⁻¹	S
1.2	0.41559	0.01039	2.46100	0.38766
1.4	0.45197	0.01130	3.82550	0.21924
1.6	0.52612	0.01315	4.52550	0.14032
1.8	0.59168	0.01479	5.16950	0.20434
2	0.67782	0.01695	5.84650	0.33212
2.2	0.7233	0.01808	6.59500	0.37791
2.4	0.83728	0.02093	7.53100	0.14679
2.6	0.93153	0.02329	9.26600	0.36611
2.8	1.02263	0.02557	10.86850	0.26393
3	1.16504	0.02913	13.41000	0.98455

Tabla 5Comportamiento Michaelis – Menten. Velocidades iniciales de variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ y $[Guayacol]$ constantes.

s^{-1}	$[H_2O_2], mM$									
	4.575	9.150	13.726	18.301	22.876	27.451	32.026	36.601	41.177	45.752
v_{01}	1.056	2.484	3.780	4.458	4.386	4.800	5.160	5.886	5.274	7.182
v_{02}	1.122	2.484	3.816	4.518	4.398	4.914	5.202	5.910	5.292	7.056
v_{03}	1.146	2.502	3.828	4.560	4.452	4.986	5.250	5.928	5.562	6.588
v_{04}	1.170	2.676	3.840	4.746	4.488	5.232	5.340	5.958	5.682	6.522
v_{05}	1.188	2.928	3.852	4.764	4.500	5.538	5.430	5.982	5.748	6.540
v_{06}	1.266	2.952	3.876	4.788	4.932	5.802	5.604	6.054	5.814	6.544
v_{07}	1.314	2.982	3.882	4.800	5.010	5.904	5.832	6.090	6.018	6.258
v_{08}	1.320	3.018	3.930	4.878	5.064	5.910	5.964	6.138	6.048	6.654
v_{09}	1.338	3.246	3.954	4.968	5.070	6.138	5.970	6.156	6.066	6.810
v_{010}	1.458	3.312	3.960	5.082	5.094	6.204	6.012	6.210	6.114	6.468
v_{011}	1.476	3.324	3.966	5.130	5.190	6.276	6.402	6.420	6.120	6.066
v_{012}	1.572	3.414	4.020	5.142	5.190	9.576	13.674	14.724	11.334	10.746
\bar{X}_{v_0}	1.286	2.944	3.892	4.820	4.815	5.609	5.651	6.067	5.794	6.608
S	0.158	0.342	0.073	0.232	0.335	0.545	0.410	0.160	0.314	0.320

Datos rechazados por la prueba Q.

Tabla 6

Comportamiento Michaelis – Menten. Variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ y $[Guayacol]$ constantes.

μL	L	$[H_2O_2], M$	$[H_2O_2], Mm$	v_0, s^{-1}	S
10	0.00001	0.00458	4.57516	1.28550	0.15811
20	0.00002	0.00915	9.15033	2.94350	0.34239
30	0.00003	0.01373	13.72549	3.89200	0.07314
40	0.00004	0.01830	18.30065	4.81950	0.23230
50	0.00005	0.02288	22.87582	4.81450	0.33489
60	0.00006	0.02745	27.45098	5.60945	0.54465
70	0.00007	0.03203	32.02614	5.65145	0.40964
80	0.00008	0.03660	36.60131	6.06655	0.15955
90	0.00009	0.04118	41.17647	5.79436	0.31443
100	0.0001	0.04575	45.75163	6.60802	0.32023

Tabla 7Comportamiento Michaelis – Menten. Velocidades iniciales de variación de [Guayacol] con [H₂O₂] y [(tpe)(DP)]Fe(III) y constantes.

s⁻¹	[Guayacol], mM									
	0.066	0.131	0.196	0.260	0.324	0.388	0.451	0.514	0.576	0.638
v₀₁	0.108	1.854	2.970	3.816	2.886	5.022	5.298	4.938	5.160	5.976
v₀₂	0.210	1.968	3.204	3.870	4.560	5.040	5.322	5.370	5.328	6.378
v₀₃	0.258	2.004	3.276	4.014	4.584	5.058	5.364	5.376	5.562	6.474
v₀₄	0.300	2.010	3.312	4.314	4.812	5.160	5.412	5.514	5.712	6.510
v₀₅	0.300	2.052	3.378	4.314	4.872	5.244	5.664	5.652	5.778	6.696
v₀₆	0.306	2.202	3.384	4.374	4.974	5.346	5.796	5.772	6.084	6.828
v₀₇	0.534	2.244	3.474	4.524	5.070	5.508	5.868	5.856	6.276	6.882
v₀₈	0.558	2.316	3.492	4.548	5.100	5.556	5.910	6.276	6.306	6.894
v₀₉	0.582	2.334	3.708	4.632	5.106	5.568	6.048	6.318	6.414	7.392
v₀₁₀	0.762	2.412	3.714	4.764	5.142	5.634	6.204	7.164	6.510	7.650
v₀₁₁	0.966	3.072	3.888	5.064	5.238	5.796	6.282	7.338	7.056	8.202
v₀₁₂	1.986	3.090	3.972	6.072	5.616	5.826	6.828	7.416	7.122	9.780
\bar{X}_{v_0}	0.444	2.226	3.481	4.385	5.007	5.397	5.833	6.083	6.109	6.898
S	0.260	0.337	0.293	0.381	0.300	0.291	0.463	0.831	0.627	0.633

Datos rechazados por la prueba Q.

Tabla 8

Comportamiento Michaelis – Menten. Variación de [Guayacol] con [(tpe)(DP)]Fe(III) y [H₂O₂] y constantes.

μL	L	[Guayacol], M	[Guayacol], mM	v₀, s⁻¹	S
10	0.00001	0.00007	0.06569	0.44400	0.26010
20	0.00002	0.00013	0.13094	2.22600	0.33659
30	0.00003	0.00020	0.19578	3.48100	0.29251
40	0.00004	0.00026	0.26019	4.38491	0.38058
50	0.00005	0.00032	0.32419	5.00673	0.30016
60	0.00006	0.00039	0.38778	5.39650	0.29099
70	0.00007	0.00045	0.45096	5.83300	0.46291
80	0.00008	0.00051	0.51374	6.08250	0.83066
90	0.00009	0.00058	0.57611	6.10900	0.62676
100	0.0001	0.00064	0.63810	6.89836	0.63299

Tabla 9Comportamiento ping-pong. Variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ y $[0.00007 \text{ Guayacol}]$ constantes.

[0.00007 Guayacol], M						
[H₂O₂], mM						
m⁻¹	0.011	0.014	0.016	0.018	0.020	0.023
v₀₁	0.147	0.176	0.225	0.240	0.233	0.261
v₀₂	0.165	0.181	0.228	0.244	0.270	0.292
v₀₃	0.171	0.202	0.240	0.249	0.273	0.296
v₀₄	0.178	0.206	0.245	0.255	0.278	0.307
v₀₅	0.180	0.217	0.248	0.256	0.283	0.309
v₀₆	0.182	0.219	0.250	0.262	0.287	0.309
v₀₇	0.187	0.220	0.254	0.263	0.289	0.315
v₀₈	0.190	0.220	0.256	0.269	0.309	0.317
v₀₉	0.191	0.226	0.266	0.269	0.323	0.329
v₀₁₀	0.205	0.237	0.285	0.300	0.343	0.352
\bar{X}_{v_0}	0.180	0.210	0.250	0.256	0.289	0.309
S	0.016	0.020	0.018	0.010	0.031	0.024

Datos rechazados por la prueba Q.

Tabla 10Comportamiento ping-pong. Variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ y $[0.00008 \text{ Guayacol}]$ constantes.

[0.00008 Guayacol], M						
$[H_2O_2]$, mM						
m^{-1}	0.011	0.014	0.016	0.018	0.020	0.023
v_{01}	0.165	0.203	0.223	0.230	0.294	0.295
v_{02}	0.172	0.206	0.240	0.265	0.294	0.317
v_{03}	0.176	0.210	0.240	0.267	0.300	0.322
v_{04}	0.178	0.211	0.243	0.269	0.302	0.324
v_{05}	0.180	0.211	0.250	0.269	0.303	0.332
v_{06}	0.183	0.211	0.251	0.271	0.309	0.336
v_{07}	0.183	0.212	0.252	0.272	0.310	0.341
v_{08}	0.186	0.220	0.259	0.280	0.314	0.341
v_{09}	0.187	0.224	0.271	0.283	0.321	0.343
v_{010}	0.193	0.229	0.272	0.286	0.329	0.379
\bar{X}_{v_0}	0.180	0.214	0.250	0.273	0.308	0.328
S	0.008	0.008	0.015	0.007	0.011	0.015

Datos rechazados por la prueba Q.

Tabla 11Comportamiento ping-pong. Variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ y $[0.00009 \text{ Guayacol}]$ constantes.

[0.00009 Guayacol], M						
[H₂O₂], mM						
m⁻¹	0.011	0.014	0.016	0.018	0.020	0.023
v₀₁	0.178	0.208	0.248	0.281	0.305	0.337
v₀₂	0.186	0.218	0.252	0.281	0.314	0.343
v₀₃	0.194	0.222	0.268	0.283	0.320	0.357
v₀₄	0.195	0.222	0.275	0.288	0.321	0.360
v₀₅	0.196	0.230	0.279	0.291	0.323	0.363
v₀₆	0.197	0.238	0.280	0.308	0.325	0.367
v₀₇	0.200	0.243	0.283	0.310	0.337	0.368
v₀₈	0.205	0.244	0.293	0.318	0.345	0.379
v₀₉	0.206	0.258	0.298	0.324	0.349	0.379
v₀₁₀	0.216	0.260	0.300	0.337	0.380	0.385
\bar{X}_{v_0}	0.197	0.234	0.277	0.302	0.332	0.364
S	0.010	0.017	0.018	0.020	0.022	0.016

Tabla 12

Comportamiento ping-pong. Gráfica primaria: variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ y $[0.00007 \text{ Guayacol}]$ constantes.

[0.00007 Guayacol], M						
μL	L	$[H_2O_2], \text{M}$	$1/[H_2O_2], \text{M}^{-1}$	$\{[(tpe)(DP)]Fe(III)\}/v_0, \text{Ms}^{-1}$	v_0, s^{-1}	v_0, min^{-1}
25	0.000025	0.01138	87.85714	0.00155	10.77480	0.17958
30	0.000030	0.01364	73.33333	0.00132	12.61740	0.21029
35	0.000035	0.01588	62.95918	0.00111	14.97540	0.24959
40	0.000040	0.01812	55.17857	0.00108	15.38532	0.25642
45	0.000045	0.02036	49.12698	0.00096	17.32500	0.28875
50	0.000050	0.02258	44.28571	0.00090	18.52200	0.30870

Tabla 13

Comportamiento ping-pong. Gráfica primaria: variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ y $[0.00008 \text{ Guayacol}]$ constantes.

[0.00008 Guayacol], M						
μL	L	$[H_2O_2], \text{M}$	$1/[H_2O_2], \text{M}^{-1}$	$\{[(tpe)(DP)]Fe(III)\}/v_0, \text{Ms}^{-1}$	v_0, s^{-1}	v_0, min^{-1}
25	0.000025	0.01138	87.85714	0.00154	10.80840	0.18014
30	0.000030	0.01364	73.33333	0.00130	12.82500	0.21375
35	0.000035	0.01588	62.95918	0.00111	15.00000	0.25000
40	0.000040	0.01812	55.17857	0.00102	16.40802	0.27347
45	0.000045	0.02036	49.12698	0.00090	18.45540	0.30759
50	0.000050	0.02258	44.28571	0.00085	19.66200	0.32770

Tabla 14

Comportamiento ping-pong. Gráfica primaria: variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(DP)]Fe(III)$ y $[0.00009 \text{ Guayacol}]$ constantes.

[0.00009 Guayacol], M						
μL	L	$[H_2O_2], M$	$1/[H_2O_2], M^{-1}$	$\{[(tpe)(DP)]Fe(III)\}/v_0, Ms^{-1}$	v_0, s^{-1}	v_0, min^{-1}
25	0.000025	0.01138	87.85714	0.00141	11.83560	0.19726
30	0.000030	0.01364	73.33333	0.00119	14.04480	0.23408
35	0.000035	0.01588	62.95918	0.00100	16.64700	0.27745
40	0.000040	0.01812	55.17857	0.00092	18.12000	0.30200
45	0.000045	0.02036	49.12698	0.00084	19.91100	0.33185
50	0.000050	0.02258	44.28571	0.00076	21.82320	0.36372

Tabla 15

Comportamiento ping-pong. Gráfica secundaria: intercepto primario vs $1/[\text{Guayacol}]$.

μL	L	$[\text{Guayacol}]$	$1/[\text{Guayacol}]$	IP
70	0.00007	0.00045	2217.48401	0.0002
80	0.00008	0.00051	1946.51741	0.0001
90	0.00009	0.00058	1735.76562	0.0001

Tabla 16

Comportamiento Michaelis – Menten. Velocidades iniciales de variación de [(tpe)(MP)]Fe(III) con [H₂O₂] y [Guayacol] constantes.

s⁻¹	[tpeMPFe(III)], Mm									
	0.007	0.008	0.009	0.010	0.011	0.012	0.014	0.015	0.016	0.017
v₀₁	1.428	2.418	3.000	3.642	4.686	5.406	6.030	6.618	7.200	7.884
v₀₂	1.506	2.544	3.030	3.690	4.728	5.586	6.096	6.762	7.350	7.926
v₀₃	1.626	2.646	3.054	3.702	4.770	5.592	6.114	6.840	7.356	8.052
v₀₄	1.776	2.670	3.126	3.726	4.878	5.622	6.336	6.942	7.506	8.112
v₀₅	1.794	2.682	3.138	3.732	5.052	5.682	6.360	6.966	7.578	8.136
v₀₆	1.848	2.700	3.192	3.768	5.136	5.700	6.396	6.996	7.608	8.148
v₀₇	1.866	2.772	3.222	3.852	5.334	5.706	6.402	7.008	7.608	8.178
v₀₈	1.884	2.880	3.366	3.972	5.340	5.790	6.408	7.044	7.632	8.214
v₀₉	1.962	2.904	3.510	4.038	5.352	5.832	6.426	7.044	7.662	8.226
v₀₁₀	1.962	2.916	3.522	4.092	5.376	5.838	6.438	7.074	7.674	8.298
v₀₁₁	2.106	2.964	3.528	4.116	5.382	5.892	6.504	7.116	7.710	8.376
v₀₁₂	2.184	3.006	3.588	4.188	5.412	5.964	6.552	7.140	7.746	8.382
\bar{X}_{v_0}	1.829	2.759	3.273	3.877	5.121	5.718	6.339	6.963	7.553	8.161
S	0.224	0.180	0.218	0.194	0.285	0.155	0.175	0.153	0.167	0.156

Datos rechazados por la prueba Q.

Tabla 17

Comportamiento Michaelis – Menten. Variación de [(tpe)(MP)]Fe(III) con [H₂O₂] y [Guayacol] constantes.

mL	Abs	[tpeMPFe(III)], mM	v₀, s⁻¹	S
1.2	0.43623	0.00685	1.82850	0.22427
1.4	0.50655	0.00795	2.75850	0.17993
1.6	0.57187	0.00898	3.27300	0.21776
1.8	0.63395	0.00995	3.87650	0.19357
2	0.72863	0.01144	5.12050	0.28531
2.2	0.78926	0.01239	5.71750	0.15521
2.4	0.86476	0.01358	6.33873	0.17537
2.6	0.94098	0.01477	6.96250	0.15324
2.8	0.99938	0.01569	7.55250	0.16738
3	1.06202	0.01667	8.16100	0.15614

Tabla 18

Comportamiento Michaelis – Menten. Velocidades iniciales de variación de [H₂O₂] con [(tpe)(MP)]Fe(III) y [Guayacol] constantes.

s⁻¹	[H₂O₂], Mm									
	12.305	15.495	18.685	21.875	25.065	28.255	31.445	34.635	37.826	41.016
v₀₁	2.244	3.522	3.594	4.506	4.998	5.544	6.570	6.480	7.734	8.958
v₀₂	2.292	3.552	3.660	4.920	5.226	5.976	6.894	6.600	8.340	9.024
v₀₃	2.304	3.570	4.386	5.760	5.802	6.504	7.175	7.446	8.520	9.282
v₀₄	2.574	3.636	4.728	5.760	5.964	6.534	7.374	7.914	8.604	9.576
v₀₅	2.586	3.654	4.800	5.832	6.228	7.194	7.374	8.040	9.180	9.870
v₀₆	2.592	3.738	4.818	5.904	6.276	7.200	7.512	8.430	9.234	10.164
v₀₇	2.658	3.744	4.848	5.958	6.414	7.218	7.524	8.742	9.282	10.236
v₀₈	2.826	3.756	4.866	6.024	6.828	7.236	7.728	8.778	9.708	10.680
v₀₉	2.892	3.798	4.950	6.084	6.936	7.260	8.616	8.844	9.750	10.878
v₀₁₀	2.982	3.846	5.052	6.240	7.068	7.410	8.742	8.850	10.116	11.124
v₀₁₁	3.012	3.888	5.100	6.384	7.158	7.422	8.856	9.324	10.296	11.400
v₀₁₂	3.072	4.320	5.118	6.570	7.320	7.434	8.934	10.176	10.368	11.628
\bar{X}_{v_0}	2.670	3.700	4.685	5.835	6.352	6.885	7.775	8.302	9.261	10.235
S	0.291	0.122	0.538	0.611	0.754	0.651	0.809	1.077	0.833	0.918

Datos rechazados por la prueba Q.

Tabla 19

Comportamiento Michaelis – Menten. Variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ y $[Guayacol]$ constantes.

μL	L	$[H_2O_2], M$	$[H_2O_2], Mm$	v_0, s^{-1}	S
27	0.00003	0.01230	12.30469	2.66950	0.29082
34	0.00003	0.01549	15.49479	3.70036	0.12226
41	0.00004	0.01868	18.68490	4.68491	0.53830
48	0.00005	0.02188	21.87500	5.83473	0.61093
55	0.00006	0.02507	25.06510	6.35150	0.75355
62	0.00006	0.02826	28.25521	6.88527	0.65056
69	0.00007	0.03145	31.44531	7.77490	0.80896
76	0.00008	0.03464	34.63542	8.30200	1.07684
83	0.00008	0.03783	37.82552	9.26100	0.83312
90	0.00009	0.04102	41.01563	10.23500	0.91837

Tabla 20

Comportamiento Michaelis – Menten. Velocidades iniciales de variación de [Guayacol] con [H₂O₂] y [(tpe)(MP)]Fe(III) y constantes.

s⁻¹	[Guayacol], mM									
	0.066	0.131	0.196	0.260	0.324	0.388	0.451	0.514	0.576	0.638
v₀₁	2.622	4.284	4.344	4.788	5.460	5.070	5.706	5.748	6.492	5.796
v₀₂	2.850	4.356	4.698	5.094	5.526	5.424	6.258	6.018	6.894	5.976
v₀₃	2.970	4.374	5.028	5.178	5.604	5.844	6.480	6.108	6.906	6.294
v₀₄	3.060	4.536	5.154	5.244	5.694	5.994	6.516	6.366	6.918	6.318
v₀₅	3.264	4.566	5.178	5.382	5.814	6.258	6.558	6.504	6.960	6.876
v₀₆	3.378	4.746	5.298	5.412	5.952	6.546	6.570	6.534	7.050	6.924
v₀₇	3.432	4.902	5.304	5.430	6.090	6.564	6.630	6.546	7.104	6.990
v₀₈	3.648	4.956	5.496	5.478	6.114	6.660	6.636	6.612	7.176	7.038
v₀₉	3.858	4.962	5.502	5.502	6.288	6.678	6.690	7.122	7.188	7.230
v₀₁₀	3.918	4.986	5.646	5.586	6.294	6.822	6.792	7.284	7.596	7.248
v₀₁₁	4.122	5.100	5.646	5.724	6.684	7.062	6.978	7.542	7.704	7.266
v₀₁₂	4.134	5.214	5.724	6.438	6.816	7.278	7.752	8.292	7.776	7.446
\bar{X}_{v_0}	3.438	4.749	5.252	5.347	6.028	6.350	6.529	6.723	7.147	6.784
S	0.505	0.316	0.411	0.259	0.439	0.658	0.328	0.719	0.377	0.548

Datos rechazados por la prueba Q.

Tabla 21

Comportamiento Michaelis – Menten. Variación de [Guayacol] con [(tpe)(MP)]Fe(III) y [H₂O₂] y constantes.

μL	L	[Guayacol], M	[Guayacol], mM	v₀, s⁻¹	S
10	0.00001	0.00007	0.06569	3.43800	0.50548
20	0.00002	0.00013	0.13094	4.74850	0.31585
30	0.00003	0.00020	0.19578	5.25150	0.41085
40	0.00004	0.00026	0.26019	5.34709	0.25854
50	0.00005	0.00032	0.32419	6.02800	0.43884
60	0.00006	0.00039	0.38778	6.35000	0.65823
70	0.00007	0.00045	0.45096	6.52855	0.32775
80	0.00008	0.00051	0.51374	6.72300	0.71903
90	0.00009	0.00058	0.57611	7.14700	0.37656
100	0.0001	0.00064	0.63810	6.78350	0.54822

Tabla 22

Comportamiento ping-pong. Variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ y $[0.00005 \text{ Guayacol}]$ constantes.

[0.00005 Guayacol], M					
$[H_2O_2]$, mM					
min^{-1}	0.014	0.016	0.018	0.020	0.023
v_01	0.056	0.072	0.061	0.073	0.086
v_02	0.057	0.072	0.063	0.074	0.088
v_03	0.057	0.072	0.068	0.082	0.089
v_04	0.058	0.074	0.070	0.087	0.090
v_05	0.061	0.074	0.071	0.089	0.095
v_06	0.061	0.074	0.077	0.090	0.095
v_07	0.061	0.076	0.077	0.091	0.097
v_08	0.062	0.079	0.080	0.091	0.097
v_09	0.063	0.083	0.085	0.092	0.098
v_010	0.063	0.085	0.086	0.093	0.099
\bar{X}_{v_0}	0.060	0.076	0.074	0.087	0.093
S	0.003	0.005	0.009	0.008	0.005

Datos rechazados por la prueba Q.

Tabla 23Comportamiento ping-pong. Variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ y $[0.00006 \text{ Guayacol}]$ constantes.

[0.00006 Guayacol], M					
[H₂O₂], mM					
min⁻¹	0.014	0.016	0.018	0.020	0.023
v₀₁	0.051	0.063	0.073	0.083	0.091
v₀₂	0.054	0.064	0.077	0.092	0.096
v₀₃	0.055	0.066	0.078	0.092	0.098
v₀₄	0.056	0.067	0.079	0.094	0.101
v₀₅	0.056	0.067	0.080	0.094	0.101
v₀₆	0.058	0.067	0.081	0.097	0.101
v₀₇	0.058	0.067	0.083	0.098	0.105
v₀₈	0.060	0.068	0.084	0.100	0.109
v₀₉	0.063	0.073	0.089	0.101	0.111
v₀₁₀	0.063	0.080	0.091	0.115	0.129
\bar{X}_{v_0}	0.057	0.067	0.081	0.095	0.101
S	0.004	0.003	0.005	0.005	0.006

Datos rechazados por la prueba Q.

Tabla 24Comportamiento ping-pong. Variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ y $[0.00007 \text{ Guayacol}]$ constantes.

[0.00007 Guayacol], M					
$[H_2O_2]$, mM					
min⁻¹	0.014	0.016	0.018	0.020	0.023
v₀₁	0.053	0.069	0.079	0.094	0.099
v₀₂	0.062	0.070	0.083	0.094	0.100
v₀₃	0.062	0.071	0.083	0.096	0.105
v₀₄	0.063	0.073	0.085	0.098	0.106
v₀₅	0.064	0.074	0.085	0.101	0.118
v₀₆	0.065	0.075	0.086	0.104	0.122
v₀₇	0.065	0.076	0.090	0.104	0.122
v₀₈	0.066	0.077	0.093	0.106	0.126
v₀₉	0.069	0.078	0.096	0.114	0.128
v₀₁₀	0.071	0.084	0.105	0.116	0.135
\bar{X}_{v_0}	0.065	0.075	0.089	0.103	0.116
S	0.003	0.004	0.008	0.008	0.013

Datos rechazados por la prueba Q.

Tabla 25

Comportamiento ping-pong. Gráfica primaria: variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ y $[0.00005 \text{ Guayacol}]$ constantes.

[0.00005 Guayacol], M						
μL	L	$[H_2O_2], M$	$1/[H_2O_2], M^{-1}$	$\{[(tpe)(MP)]Fe(III)\}/v_0, Ms^{-1}$	v_0, s^{-1}	v_0, min^{-1}
30	0.000030	0.01364	73.33333	0.00484	3.4470	0.05745
35	0.000035	0.01588	62.95918	0.00416	4.0122	0.06687
40	0.000040	0.01812	55.17857	0.00377	4.4244	0.07374
45	0.000045	0.02036	49.12698	0.00321	5.2020	0.08670
50	0.000050	0.02258	44.28571	0.00298	5.6034	0.09339

Tabla 26

Comportamiento ping-pong. Gráfica primaria: variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ y $[0.00006 \text{ Guayacol}]$ constantes.

[0.00006 Guayacol], M						
μL	L	$[H_2O_2], M$	$1/[H_2O_2], M^{-1}$	$\{[(tpe)(MP)]Fe(III)\}/v_0, Ms^{-1}$	v_0, s^{-1}	v_0, min^{-1}
30	0.000030	0.01364	73.33333	0.00465	3.5892	0.05982
35	0.000035	0.01588	62.95918	0.00372	4.4802	0.07467
40	0.000040	0.01812	55.17857	0.00342	4.8774	0.08129
45	0.000045	0.02036	49.12698	0.00294	5.6718	0.09453
50	0.000050	0.02258	44.28571	0.00274	6.0828	0.10138

Tabla 27

Comportamiento ping-pong. Gráfica primaria: variación de $[H_2O_2]$ con $[(tpe)(MP)]Fe(III)$ y $[0.00007 \text{ Guayacol}]$ constantes.

[0.00007 Guayacol], M						
μL	L	$[H_2O_2], M$	$1/[H_2O_2], M^{-1}$	$\{[(tpe)(MP)]Fe(III)\}/v_0, Ms^{-1}$	v_0, s^{-1}	v_0, min^{-1}
30	0.000030	0.01364	73.33333	0.00426	3.9102	0.06517
35	0.000035	0.01588	62.95918	0.00366	4.5588	0.07598
40	0.000040	0.01812	55.17857	0.00314	5.3142	0.08857
45	0.000045	0.02036	49.12698	0.00270	6.1644	0.10274
50	0.000050	0.02258	44.28571	0.00232	7.2000	0.12000

Tabla 28

Comportamiento ping-pong. Gráfica secundaria: intercepto primario vs $1/[\text{Guayacol}]$.

μL	L	$[\text{Guayacol}]$	$1/[\text{Guayacol}]$	IP
50	0.00005	0.00032	3084.577	0.0001
60	0.00006	0.00039	2578.773	-0.0002
70	0.00007	0.00045	2217.484	-0.0006