

00585  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Síntesis, caracterización y actividad catalítica de  
compuestos modelos de peroxidasas

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN QUÍMICA**  
(INORGÁNICA)

PRESENTA:

*Ma. Concepción* **Yasmi Reyes Ortega**

ASESOR:

**Dr. Cecilio Álvarez Toledano**

TESIS CON  
FALSA DE ORIGEN

1998



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## JURADO:

Presidente:	Dra. Rosalinda Contreras Theurel (CINVESTAV)
Primer Vocal:	Dra. Lena Ruíz Azuara (UNAM)
Segundo Vocal:	Dr. Hugo Torrens Miquel (UNAM)
Tercer Vocal:	Dra. Norah Barba Behrens (UNAM)
Secretario:	Dr. Enrique González Vergara (BUAP)
Primer Suplente:	Dr. Armando Cabrera Ortíz (I.Q., UNAM)
Segundo Suplente:	Dr. Jesús Valdez Martínez (I.Q., UNAM)

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio No. 4 de Química Inorgánica del Instituto de Química de la UNAM, con los apoyos económicos del CONACYT y del PADEP.

## AGRADECIMIENTOS

A mi Universidad Autónoma de Puebla por haberme apoyado en la realización de todos mis estudios profesionales.

A la Universidad Nacional Autónoma de México en la que realicé los estudios doctorales.

A mis asesores: Dr. Cecilio Álvarez T., Dr. Rafael Zamorano U. y Dra. Adela Rodríguez R. por su apoyo, y por compartirme sus conocimientos y experiencias en el campo de la investigación.

Al Dr. Sylvain Barnés por su ayuda en la tediosa parte experimental de las mediciones cinéticas, y por su apoyo y entusiasmo.

A la Dra. Rosalinda Contreras T. por haberme guiado en la difícil tarea de escribir los resultados de este trabajo.

A mi familia y amigos, quienes siempre tuvieron confianza en mí.

## DEDICADA A:

Mis dos hijos, Jaime y Gabriel, quienes han sido mis amores, mis amigos, mis maestros y me han motivado y dulcificado cada instante de mi vida.

Las mujeres de mi familia: mi madre Guadalupe, mis queridísimas hermanas América, Gabriela, Elva y Martha; mis sobrinas Elenita, Ale, Ameriquita, Elbita, Caro y Carlita; mi sobrina-nieta Niki; mis cuñadas Ma. Elena y Sara Laura.

Los hombres de mi familia: mi padre Rodolfo (QEPD), mis hermanos Pedro, Rodolfo y Fidel; mis sobrinos Rodo, Richi, Alvarito, Javi y Rodrigo; mi sobrino-nieto Alejandrino; mis cuñados Álvaro, Javier y Luis Antonio; al padre de mis hijos, Isaac.

Mis amigos de Puebla, de México, de Yucatán, de la BUAP, de la UNAM, del Poli, de la UAM.

Los hombres de mi vida.

# INDICE

<i>página</i>	
<i>i</i>	Resumen
<b>1</b>	<b>I. INTRODUCCIÓN</b>
<b>3</b>	I.1 <i>Justificación</i>
<b>4</b>	I.2 <i>Hipótesis de trabajo</i>
<b>5</b>	I.3 <i>Objetivos</i>
<b>8</b>	<b>II. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS COMPLEJOS DE PORFIRINAS-Fe(III) Y DEL COMPLEJO DE CLORINA-Cu(II)</b>
<b>9</b>	II.1 <i>Antecedentes</i>
<b>19</b>	II.2 <i>Parte experimental</i>
<b>19</b>	II.2.1 Instrumentos, condiciones y materiales
<b>21</b>	II.2.2 Metodología
<b>21</b>	II.2.2.1 Obtención de protohemina
<b>21</b>	II.2.2.2 Obtención de cloroproporfirina IX-Fe(III) dimetiléster
<b>22</b>	II.2.2.3 Obtención de cloromesoporfirina IX-Fe(III) dimetiléster
<b>23</b>	II.2.2.4 Obtención de clorodeuteroporfirina IX-Fe(III) dimetiléster
<b>24</b>	II.2.2.5 Obtención de 1,9-bis(2'-piridil)-2,5,8-triazanonano (picdien)
<b>24</b>	II.2.2.6 Obtención de los complejos: protoporfirina-Fe(III)-picdien mesoporfirina-Fe(III)-picdien deuteroporfirina-Fe(III)-picdien clorina-Cu(II)-picdien
<b>28</b>	II.3 <i>Caracterización espectroscópica de los complejos de Fe(III) obtenidos. Resultados, discusión y conclusiones</i>
<b>28</b>	II.3.1 Ultravioleta-Visible
<b>39</b>	II.3.2 Dicroísmo Circular Magnético
<b>51</b>	II.3.3 Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H
<b>63</b>	II.3.4 Resonancia Paramagnética Electrónica

75	II.4 <i>Caracterización espectroscópica del complejo de Cu(II) obtenido. Resultados, discusión y conclusiones</i>
75	II.4.1 Ultravioleta-Visible
77	II.4.2 Dicroísmo Circular Magnético
80	II.4.3 Resonancia Magnética de protón.
82	II.4.4 Resonancia Paramagnética Electrónica
83	II.4.5 Simulación de espectros y cálculo de parámetros de orbitales moleculares
89	II.4.6 Diagrama de energía
90	II.5 <i>Conclusiones de los estudios espectroscópicos de los complejos porfirinas-Fe(III)-picdien y clorina-Cu(II)-picdien</i>
90	II.5.1 Estructura propuesta para los nuevos complejos reportados
92	<b>III. PRUEBAS DE ACTIVIDAD CATALÍTICA COMO PEROXIDASA DE LOS COMPLEJOS OBTENIDOS</b>
92	III.1 <i>Antecedentes</i>
98	III.2 <i>Parte experimental</i>
98	III.2.1 Instrumentos y materiales
98	III.2.2 Metodología y tratamiento de datos
104	III.3 <i>Presentación de datos</i>
107	III.4 <i>Modelos cinéticos de peroxidasa</i>
109	III.5 <i>Determinación de las constantes de Michaelis, de velocidad máxima teórica y conclusiones</i>
116	III.6 <i>Presentación de resultados. Discusión y conclusiones.</i>
130	<b>IV. ESTUDIOS ESPECTROSCÓPICOS DE LA REACCIÓN DE LOS COMPLEJOS DE PORFIRINAS-Fe(III)-PICDIEN CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO</b>
131	IV.1 <i>Antecedentes</i>
136	IV.2 <i>Instrumentos, materiales y condiciones</i>
137	IV.3 <i>Datos de resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H y discusión</i>
140	IV.4 <i>Datos de resonancia paramagnética. Discusión y conclusiones</i>
143	<b>V. CONCLUSIONES GENERALES</b>
148	<b>Referencias</b>
156	Apéndices
	1. <i>Espectros de UV-Vis, DCM, RMN de protón, RPE</i>
	2. <i>Tablas y gráficas de cinéticas</i>

## RESUMEN

Los estudios estructurales, electrónicos y magnéticos de compuestos modelo de peroxidasas a partir de hierro(III)-porfirinas que presenten, como la enzima, mezcla cuántica de estados de espín (*mce*)  $|5/2\rangle$  y  $|3/2\rangle$ , y la correlación con su posible actividad como peroxidasa, es fundamental. Por ello, se obtuvieron cuatro complejos nuevos de una nueva familia a la que se le denominó de porfirinas-pinza (dos grupos piridilo unidos por una cadena se coordinan axialmente al hierro haciendo una especie de pinza que pellizca al plano hemo): protoporfirina IX-hierro(III)-picdien (**5**), mesoporfirina IX-hierro(III)-picdien (**6**), deuteroporfirina IX-hierro(III)-picdien (**7**) y clorina-cobre(II)-picdien (**8**). Los derivados de Fe(III), se estudiaron cinética y espectroscópicamente (UV-Vis, de DCM, de RMN de  $^1\text{H}$  y de RPE) como modelos de peroxidasa. Los valores de las constantes de velocidad máxima teórica para la reacción característica de peroxidasa -guayacol +  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$  productos de oxidación del guayacol- en presencia de cada uno de los complejos **5-7**, fueron  $7.62 \times 10^6$ ,  $4.37 \times 10^5$  y  $9.05 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  respectivamente. Sus espectros de UV-Vis son típicos de complejos porfirina-Fe(III) hexacoordinados con una simetría  $\leq D_{4h}$ . Los espectros de DCM son del tipo A o pseudo A característicos de porfirina-Fe(III) alto espín. Las frecuencias de los desplazamientos de RMN de protón (meso,  $\text{CH}_3$ -hemo) y de RPE muestran complejos hexacoordinados con diferentes grados de *mce*  $S = 5/2$ ,  $S = 3/2$  para cada compuesto. La relación de las áreas de las señales de RPE de las dos especies magnéticas, sigue el mismo orden decreciente **5-7** que la actividad catalítica mostrada. Se hicieron reaccionar **5-7** con  $\text{H}_2\text{O}_2$  para observar al intermediario radical- $\pi$  catiónico ferrilo propuesto, por espectroscopía de RMN de  $^1\text{H}$  y de RPE. Sus espectros de RMN de protón muestran señales en frecuencias características del ferrilo. Por RPE se observaron varias especies: Fe(III) alto espín, posible Fe(IV) del ferrilo y radical. El complejo clorina-Cu(II)-picdien **8** se preparó para hacerle estudios espectroscópicos que complementaran a los de Fe(III). Los espectros de UV-Vis y DCM (de **4** y **8**) muestran cambios de energías del Soret y de las bandas *Q* (cuatro) indicando una distribución electrónica diferente. Se propone una simetría  $D_{2h}$  como grupo puntual. De las simulaciones computacionales de los espectros RPE de **4** y **8**, se obtuvieron: mínimo seis ligantes nitrógeno alrededor del ion cúprico, los valores del tensor *g*, los tensores hiperfino y superhiperfino del cobre(II) y se calcularon los coeficientes de enlace, covalencia y el parámetro de distorsión  $g_{II}/A_{II}$ . La coordinación axial del ligante picdien cambia apreciablemente las propiedades electrónicas y magnéticas de **8**. Así, los cambios magnéticos encontrados en estos nuevos modelos de peroxidasa **5-7** y su correlación con su comportamiento cinético apoyan la propuesta de que un mecanismo de finísima sensibilidad sucede durante la función bioquímica de la enzima nativa, donde el espín intermedio juega un papel central. Estos nuevos modelos **4-6** son una aportación importante para el conocimiento de las enzimas peroxidasa.

## SUMMARY

The structural, electronic and magnetic studies of model compounds of peroxidase, which have been synthesized starting from porphyrin-Fe(III), possessing quantum mixed spin states ( $qms$ )  $|5/2\rangle$  and  $|3/2\rangle$  are important. But, the correlation with their catalytic peroxidase activity is fundamental. For all that, four novel complexes of a novel family namely pinch-porphyrin -the pyridyl ending groups of the 1, 9-bis(2'-pyridyl)-2, 5, 8-triazanonane (picdien) are linked axially to the porphyrin group: protoporphyrin-Fe(III)-picdien **5**, mesoporphyrin-Fe(III)-picdien **6**, deuteroporphyrin-Fe(III)-picdien **7** and chlorin-Cu(II)-picdien **8**, were synthesized. These complexes were characterized by UV-VIS,  $^1\text{H-NMR}$  and ESR spectroscopies and their catalytic activity was determined. The measured theoretical maximum rate constant ( $k_{\text{cat}}$ ) for - guaiacol +  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$  oxidation guaiacol products - in presence of porphyrin-Fe(III)-picdien **5**, **6** and **7** complexes, resulted  $7.62 \times 10^6$ ,  $4.37 \times 10^5$  and  $9.05 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  for each compound. Their UV-VIS spectra show Soret and  $Q$  bands at energies typical of hexacoordinated complexes with symmetry  $D_{4h}$  or lower. The  $^1\text{H-NMR}$  high frequency shifts, the mesoproton and the pyrrole methyls shifts are indicative of hexacoordinated complexes with differing degrees of  $qms$   $S = 5/2$  into  $S = 3/2$ . Compound **7** shows the minimum quantum mixing, being almost a pure high spin  $S = 5/2$ , system. The ESR spectral features are characteristic of  $qms$  species ( $S = 5/2$ ,  $S = 3/2$ : A, B), for each compound. The area ratio of the ESR B/A signals follow the same order as the peroxidase activity shown by these complexes. A clear correlation is established among the peroxidase activity, the iron(III) out-of-the-porphyrin plane configuration and the  $qms$   $S = 5/2$  and  $S = 3/2$ . Complexes **8** and **4** were characterized by  $^1\text{H-NMR}$ , UV-VIS and ESR spectroscopies. The covalent bonding of the ending pyridyl rings of picdien to the fifth and sixth coordination sites of the Cu(II)-chlorin complex induces electronic redistribution in the molecule but does not produce a distortion of the chlorin ring. Optical absorption spectra show at slightly different energies for the Soret and four  $Q$  bands indicating distinct electronic distributions.  $D_{2h}$  molecular point group is proposed for both compounds. The ESR spectroscopic  $g$  tensor, the Cu-hyperfine and nitrogen superhyperfine tensors were determined and used to calculate the bonding coefficients, the covalent character of bonds and the  $g_{II}/A_{II}$  distortion parameter for both compounds. The axial coordination of the picdien ligand changes appreciably its electronic and magnetic properties. So, the magnetic changes found for new model compounds (**5-7**) strongly support the proposal of a sensitive fine tuning mechanism during the biochemical function of the native enzymes where the intermediate spin state plays a central role. So, these model compounds (**5-7**) are an important contribution for knowledge enzymes peroxidase functionality.

Los estudios sobre metaloproteínas que contienen porfirinas en su sitio activo, han demostrado que ese macrociclo puede adquirir diferentes conformaciones, lo que les permite llevar a cabo diferentes funciones como: fotosíntesis,<sup>1</sup> enlazamiento reversible de dioxígeno,<sup>2,3</sup> transferencia de electrones,<sup>4</sup> peroxidación.<sup>5</sup>

Las estructuras químicas de coordinación de las hemoproteínas-hierro(III) -que proveen la posibilidad de una enorme variedad de estados magnéticos únicos para cada comportamiento bioquímico- constituyen una fuente inagotable de estudios teóricos y experimentales.<sup>6-10</sup> De la información obtenida en esos estudios, se han podido establecer tres posibles estados magnéticos de espín para los cinco electrones *d* del hierro(III). Dos de ellos pueden existir como estados puros: el alto espín  $S = 5/2$  y el bajo espín  $S = 1/2$ , los cuales pueden mezclarse térmicamente en un arreglo de moléculas que finalmente serán detectadas en alguno de esos dos estados de espín puros.<sup>6,9</sup> El tercer estado magnético de espín, llamado intermedio  $S = 3/2$ , se ha observado solamente mezclado cuánticamente con el alto espín  $5/2$ . Existe una función de onda que contiene términos importantes de las contribuciones de los diferentes estados de espín presentes en la mezcla.<sup>6,9</sup> Específicamente es en proteínas férricas como el ferricitocromo *c'* de chromatium,<sup>8</sup> la peroxidasa de rábano blanco (horseradish)<sup>11</sup>, la peroxidasa de eosinofilo,<sup>12</sup> la peroxidasa de calabacita (zucchinni),<sup>13</sup> entre otras, que este raro fenómeno de la mezcla cuántica de estados de espín  $S = 3/2$  y  $S = 5/2$  propuesta por Maltempo y Moss en 1974,<sup>7</sup> se presenta.

En un intento por contribuir en el área de los modelos de peroxidasas, el presente trabajo de investigación se propuso como objetivo principal preparar nuevos complejos hexacoordinados derivados de porfirinas-Fe(III) cuyos ligantes de la quinta y sexta posiciones permanecerían unidos a través de una cadena. De acuerdo al nuevo diseño, la longitud y características de la cadena que une a los ligantes axiales, la fuerza de campo ligante de los ligantes axiales, conjuntamente con los sustituyentes periféricos del anillo porfirínico deberían ser determinantes para que las coordinaciones axiales no fueran equivalentes y con estados de espín puros  $1/2$  o

5/2. Se intentaría promover el estado de espín cuánticamente mezclado 3/2, 5/2 característico de las enzimas peroxidasa.

Independientemente del estado de espín que presentaran los complejos diseñados, se les haría una prueba cualitativa típica de las enzimas peroxidasa para poder correlacionar su estructura química, electrónica y magnética con su actividad catalítica. Un complejo similar a los anteriores pero con cobre(II) se prepararía para obtener información espectroscópica colateral complementaria, que no puede obtenerse de los complejos de hierro(III). Las espectroscopías utilizadas serían de UV-Vis, DCM, de RMN de protón y de RPE.

### *I.1 Justificación*

Son varias las consideraciones que justifican la investigación que se propone en este trabajo, que conformará una tesis doctoral, y que a continuación se presentan.

La determinación de las estructuras y de los funcionamientos que las enzimas peroxidasa tienen en los seres vivos ha sido uno de los conocimientos que ha apasionado a los grupos de investigación en esta área.<sup>14-18</sup> Sin embargo, esto no ha sido suficiente para conocer cuáles son los mecanismos que esas macromoléculas siguen para llevar a cabo la variedad de funciones de acuerdo a las diferencias, a veces sutiles, de las estructuras de sus sitios activos.<sup>14-18</sup>

El diseño y la obtención de nuevos complejos, a partir de porfirinas-Fe(III), que se han estudiados por diferentes métodos espectroscópicos son por sí mismos una valiosa aportación para el conocimiento químico, puesto que permiten sistematizar su comportamiento espectroscópico con base en sus estructuras más probables o exactas (si se resuelven por espectroscopía de rayos-X).

Es aún más interesante ese estudio si el comportamiento espectroscópico de los nuevos complejos con hierro-hemo mimetizan el comportamiento espectroscópico de las peroxidasa nativas, puesto que son moléculas estructuralmente más sencillas, que modelan sus sitios activos.

Por otro lado, si a esos nuevos complejos, modelos espectroscópicos de las enzimas peroxidasa, se les hacen pruebas cualitativas y cuantitativas como catalizadores de reacciones de óxido-reducción características de las enzimas peroxidasa, se puede establecer una serie de correlaciones muy importantes entre la estructura de los hierro complejos, su comportamiento espectroscópico y su actividad como peroxidasa. Es fundamental valorar esa capacidad catalítica, independientemente de que sea cercana o no a la de la enzima nativa, puesto que permite conocer cómo ha sido cambiada la actividad como peroxidasa que presentan las porfirinas-Fe(III) *per se*, con la preparación de sus nuevos derivados.

Conocer más exactamente el mecanismo de catálisis de las peroxidasas es potencialmente importante para la catálisis en general, entre otras la oxidación de alcanos,<sup>19,20</sup> epoxidación de alquenos.<sup>21-23</sup> Su inmovilización en soportes de filtros eliminadores de contaminantes aromáticos o iones metálicos.<sup>24</sup>

## 1.2 Hipótesis de trabajo

A partir de las hierroporfirinas es posible sintetizar sus complejos con ligantes axiales (en quinta y sexta posiciones) coordinados al metal, y que además tengan una cadena que pueda enlazarlos covalentemente con las cadenas de la porfirina (cadenas propiónicas). Una nueva posibilidad sería aquella en la que los ligantes coordinados a la metaloporfirina en la quinta y sexta posiciones estuvieran unidos entre ellos por una cadena alquílica sin enlazarse covalentemente al anillo porfirínico. Los sustituyentes axiales conjuntamente con los del macrociclo controlarían el estado magnético del hierro(III) y permitirían el movimiento de densidad electrónica hacia el metal. Sería fundamental que uno de los dos ligantes axiales debiera permanecer coordinado al hierro durante el proceso catalítico, como lo propuesto para las peroxidasas, puesto que estabilizaría los altos estados de oxidación del metal, al mismo tiempo que el otro se separaría momentáneamente, lo que permitiría la oxidación del complejo el cual efectuaría su función oxidante sobre un sustrato. Todo el conjunto daría un comportamiento reversible de enzima peroxidasa.

## *1.2 Objetivos*

- 1.** Estudiar la posibilidad de la reacción entre los cloruros de protoporfirina IX-hierro(III) **1**, mesoporfirina IX-hierro(III) **2**, deuteroporfirina IX-hierro(III) **3**, ésteres dimetílicos, y la clorina-cobre(II) **4**, sal trisódica, con el compuesto 1,9-bis(2'-piridil)-2,5,8-triazanonano (picdien).\*
- 2.** Si las reacciones del inciso (*I*) se llevan a cabo se realizarán los estudios de espectroscopías de UV-Vis, RMN de  $^1\text{H}$ , RPE y DCM de los nuevos complejos, y en caso de que cristalizara alguno de ellos, se realizaría el estudio de difracción de rayos-X.
- 3.** Así mismo, se realizarían las pruebas cualitativas de actividad como peroxidasa con cada uno de esos nuevos complejos.
- 4.** En caso de que alguno de los nuevos complejos diera positiva la prueba de actividad como peroxidasa, se efectuaría el estudio cinético para determinar sus parámetros catalíticos.
- 5.** Con base en los estudios espectroscópicos y cinéticos se propondría una estructura para esos nuevos complejos obtenidos.
- 6.** Se establecería en lo posible la relación entre la estructura propuesta para los nuevos complejos, el estado de espín del metal central y la función catalítica como peroxidasa de aquellos que la presentaran. Así mismo, se haría la comparación del comportamiento espectroscópico y cinético de los nuevos modelos con los de la peroxidasa nativa.

\*Para facilitar la lectura, las estructuras de los compuestos que se utilizarán se presentan en las páginas 6 y 7 en las Figuras 1-3.

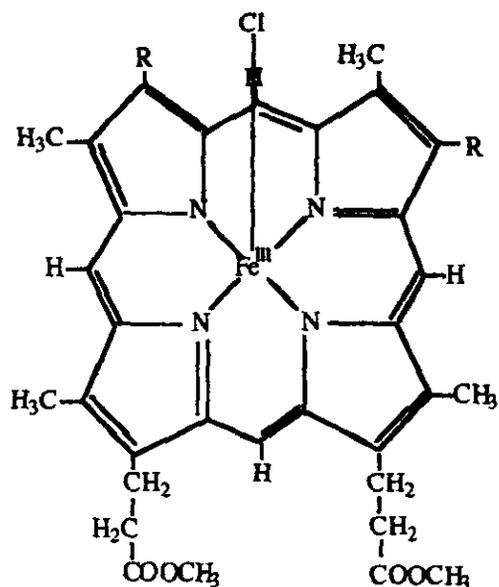


Figura 1. Estructura de las porfirinas-Fe(III) utilizadas como materia prima. Para  $R = CH = CH_2$ , cloruro de protoporfirina IX-hierro(III) éster dimetílico 1. Para  $R = CH_2 - CH_3$ , cloruro de mesoporfirina IX-hierro(III) éster dimetílico 2. Para  $R = H$ ; cloruro de deuteroporfirina IX-hierro(III) éster dimetílico 3.

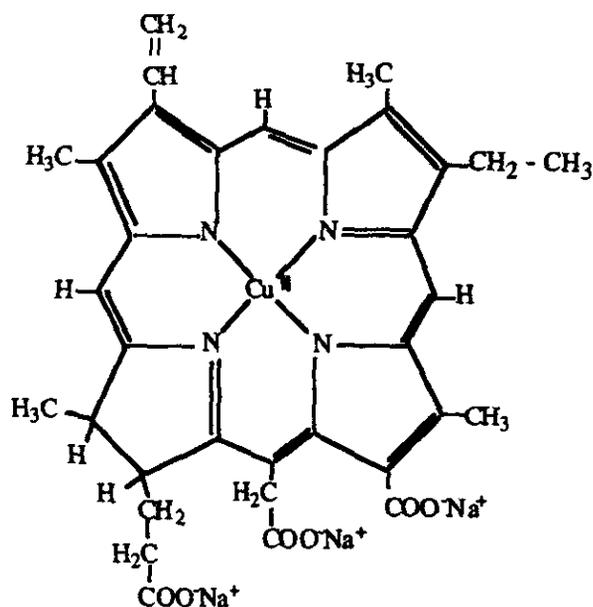


Figura 2. Clorina-Cu(II) (clorofilina) 4

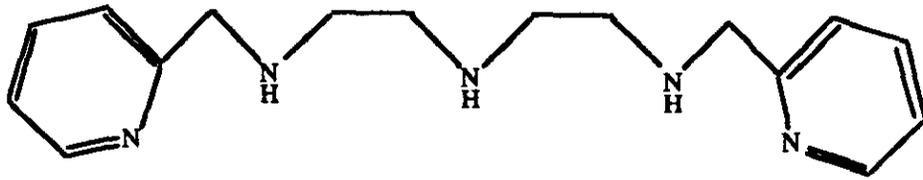


Figura 3. 1,9-bis(2'-piridil)-2, 5, 8-triazanonano (picdien)

**II. Síntesis y caracterización espectroscópica  
de los complejos de porfirina-Fe(III)  
y del complejo de clorina-Cu(II)**

## II.1 Antecedentes

Las funciones biológicas de las hemoproteínas son el transporte de electrones (*citocromo c peroxidasa*), transporte de oxígeno (hemoglobina), y la catálisis de reacciones redox (*peroxidasa de rábano blanco, horseradish HRP, citocromo P-450*); todas tienen como grupo prostético (grupo no protéico de una proteína) la protoporfirina IX-hierro(III) o hierro(II) (8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-2,18-dipropionato de metil porfina).<sup>1,25</sup>

Las peroxididasas son algunas de las primeras enzimas descubiertas. Schönbein en 1855 observó la oxidación de guayacol con peróxido de hidrógeno en presencia de sustancias que se encontraban en plantas y animales. Dedujo que era la misma sustancia la que activaba y descomponía al peróxido. Sin embargo, el descubrimiento formal de la *peroxidasa de rábano blanco (HRP)* ocurrió en 1903.<sup>4</sup>

En 1937 se estableció que la *catalasa* y la *peroxidasa* reaccionaban con el peróxido de hidrógeno para dar dos intermediarios un complejo verde (llamado Compuesto I) seguido de uno rojo (llamado Compuesto II).<sup>25</sup> A partir de entonces se realizaron experimentos para conocer y caracterizar los intermediarios de la oxidación de hierro-hemoproteínas sin que hasta la fecha se tenga una estructura definitiva. Inicialmente se propuso que el intermediario rojo (Compuesto II) tiene para el hierro un número de oxidación de +4.<sup>25</sup>

En las reacciones de oxidación de fenoles con peróxido de hidrógeno catalizadas con *peroxidasa de rábano blanco (HRP)*, se encontró que la reacción procede por lo menos en dos etapas que involucran radicales libres.<sup>26</sup>

Se investigaron posteriormente las estructuras de los sitios activos de las hierro-hemoenzimas mediante la espectroscopía de UV-Vis,<sup>27-29</sup> RMN de <sup>1</sup>H,<sup>30-32</sup> RPE,<sup>33-35</sup> DCM,<sup>36-38</sup> Mössbauer.<sup>11,39</sup> Por difracción de rayos-X se resolvieron estructuras cristalinas de algunas peroxididasas<sup>14-18</sup> (Figuras 4a y 4b; Tabla 1).

Tabla 1. Características de diferentes peroxidases. Algunas de ellas sin estructura resuelta.

Enzima	Grupo prostético	Fe(II) Fe(III)	PM Dalton	* Ca <sup>2+</sup>	Aminoácidos lado proximal	Aminoácidos lado distal	Ref. No.
<i>Citocromo C peroxidasa de levadura (rayos-X)</i>	protoporfirina IX-Fe(III)	Fe(III)	33mil	-	His175 Asp235	Arg48, Trp51 His52, W595	14 40
<i>Citocromo c peroxidasa de pseudomona aeruginosa</i>	protoporfirina IX-Fe(III)	Fe(II) Fe(III)	-	-	His	His240 Arg117	40
<i>Peroxidasa de Tiroides</i>	protoporfirina IX-Fe(III)	Fe(III)	90mil	-	-	-	40
<i>Lignina peroxidasa (rayos-X)</i>	protoporfirina IX-Fe(III)	Fe(III)	41mil	1prox 1dist	His176 Asp238	Phe46, His47, Arg43	17 40
<i>Coprinus cinereus peroxidasa (rayos-X)</i>	protoporfirina IX-Fe(III)	Fe(III)	-	1prox 1dist	His183 Asp245	Arg51, Phe54, His183	16 40
<i>Mieloperoxidasa (rayos-X)</i>	protoporfirina IX-Fe(III)	Fe(III)	140mil	-	His336, Asn421	His95, Arg239, Asp96	40
<i>Lactoperoxidasa</i>	protoporfirina IX-Fe(III)	Fe(III)	78mil	-	His, Asn	-	40
<i>Peroxidasa de calabacita (zucchini)</i>	protoporfirina IX-Fe(III)	Fe(III)	40mil	-	His	-	13
<i>Catalasa rayos-X</i>	protoporfirina IX-Fe(III)	Fe(III)	220- 350mil	-	Tyr357, Arg353	Phe160, His74, Asn147	15
<i>Peroxidasa de rábano blanco (horseradish HRP)</i>	protoporfirina IX-Fe(III)	Fe(III)	42mil	1prox 1dist	His170, Asp247	Arg38, His42, Asn70, Asp43	40

\*En el sitio activo

Todas las peroxidases tienen en su sitio activo como grupo prostético la protoporfirina IX-Fe(III)

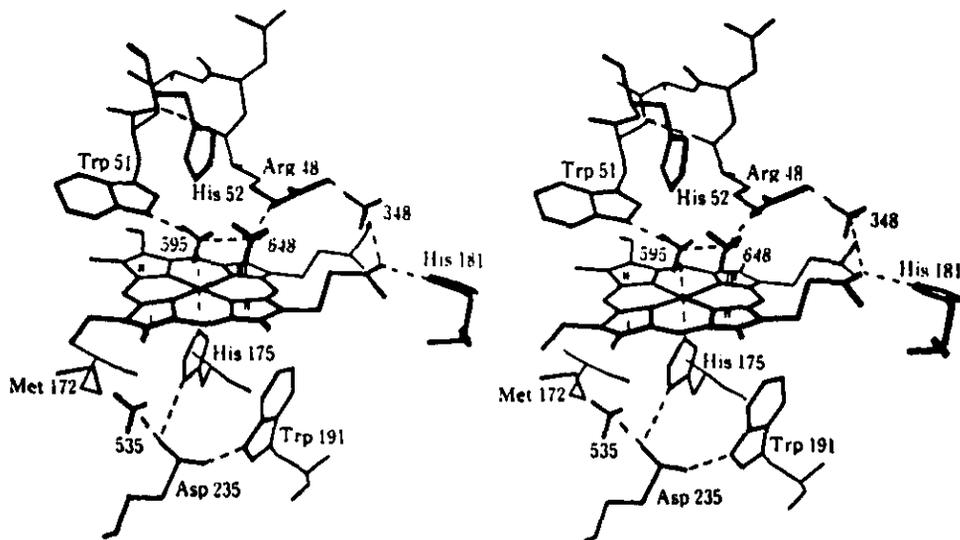


Figura 4a. Vista estereoscópica del sitio activo del *citocromo c peroxidasa de levadura*.<sup>41</sup> (Zona axial distal aquella en la cual los residuos de los aminoácidos presentes se encuentran a distancias tales que no permiten contemplar una coordinación formal, en la zona proximal si hay coordinación al hierro).

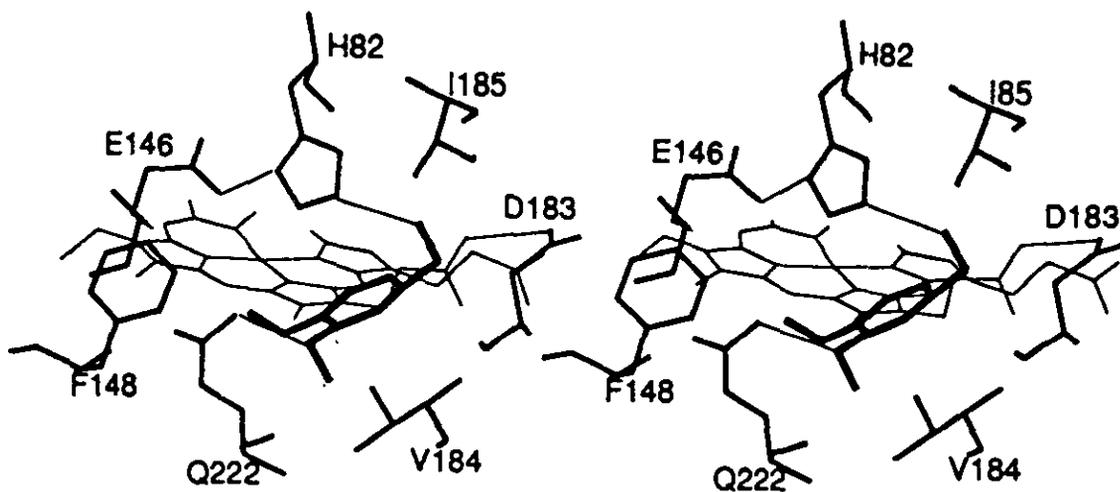


Figura 4b. Vista estereoscópica del sitio activo de la enzima *lignina peroxidasa*. Las esferas negras representan moléculas de disolvente. El patrón de enlaces por puente de hidrógeno se encuentra también en *citocromo c peroxidasa*.<sup>17</sup>

La determinación de la estructura de la *citocromo c peroxidasa* de levadura y los estudios acerca de la formación de los intermediarios (Compuestos I y II) durante el ciclo catalítico de las peroxidasas, llevaron a la propuesta del posible mecanismo de catálisis. El mecanismo propuesto es de tipo concertado en el cual en la medida en la que fluye densidad electrónica hacia el hierro(III) en la parte proximal, hay un movimiento de salida de densidad electrónica hacia la parte distal, todo esto para promover la ruptura heterolítica del peróxido de hidrógeno. La histidina distal actúa como un catalizador ácido-base para transferir un protón del peróxido de hidrógeno al átomo de oxígeno del peróxido enlazado al hierro. La carga negativa del oxígeno desprotonado es estabilizada por el protón de la arginina distal. La estructura cristalina de aductos estables de *citocromo c peroxidasa* ha demostrado que la Arg48 e His52 se mueven para interactuar con los ligantes, lo que evidencia la flexibilidad del paquete de estos enlazadores de ligantes. En la Figura 5 se presenta detalladamente el mecanismo de reacción propuesto.<sup>42</sup>

Estudios sobre la *citocromo c peroxidasa* mutante-1 CCP(MI) muestra que la His52 y Arg48 (de la zona distal) son muy importantes en el control de la velocidad de formación del Compuesto I. Consistente con la donación del protón del peróxido a la histidina distal, se ha reportado un grupo con un  $pK_a$  de 4 que debe ser desprotonado para facilitar el enlace del peróxido. En la *citocromo c peroxidasa de levadura*, si se cambia o muta la arginina48 (Arg) (parte distal) por leucina (Figura 6) se reduce la velocidad de formación del Compuesto I ( $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) en un orden de 10, pero si en su lugar se pone una lisina (Figura 6) se reduce hasta en dos órdenes la velocidad lo que indica la importancia que tiene la presencia de un grupo polar cargado positivamente en esa posición como promotor de la separación de cargas.<sup>40</sup>

Si en la parte proximal se muta el aspartato235 (Asp) por aspargina (Figura 7) la velocidad de formación del Compuesto I disminuye cinco veces. La presencia del aspartato235 lleva a la desprotonación del imidazol de la histidina175 que es sumamente importante para la activación del peróxido de hidrógeno (Figura 5).

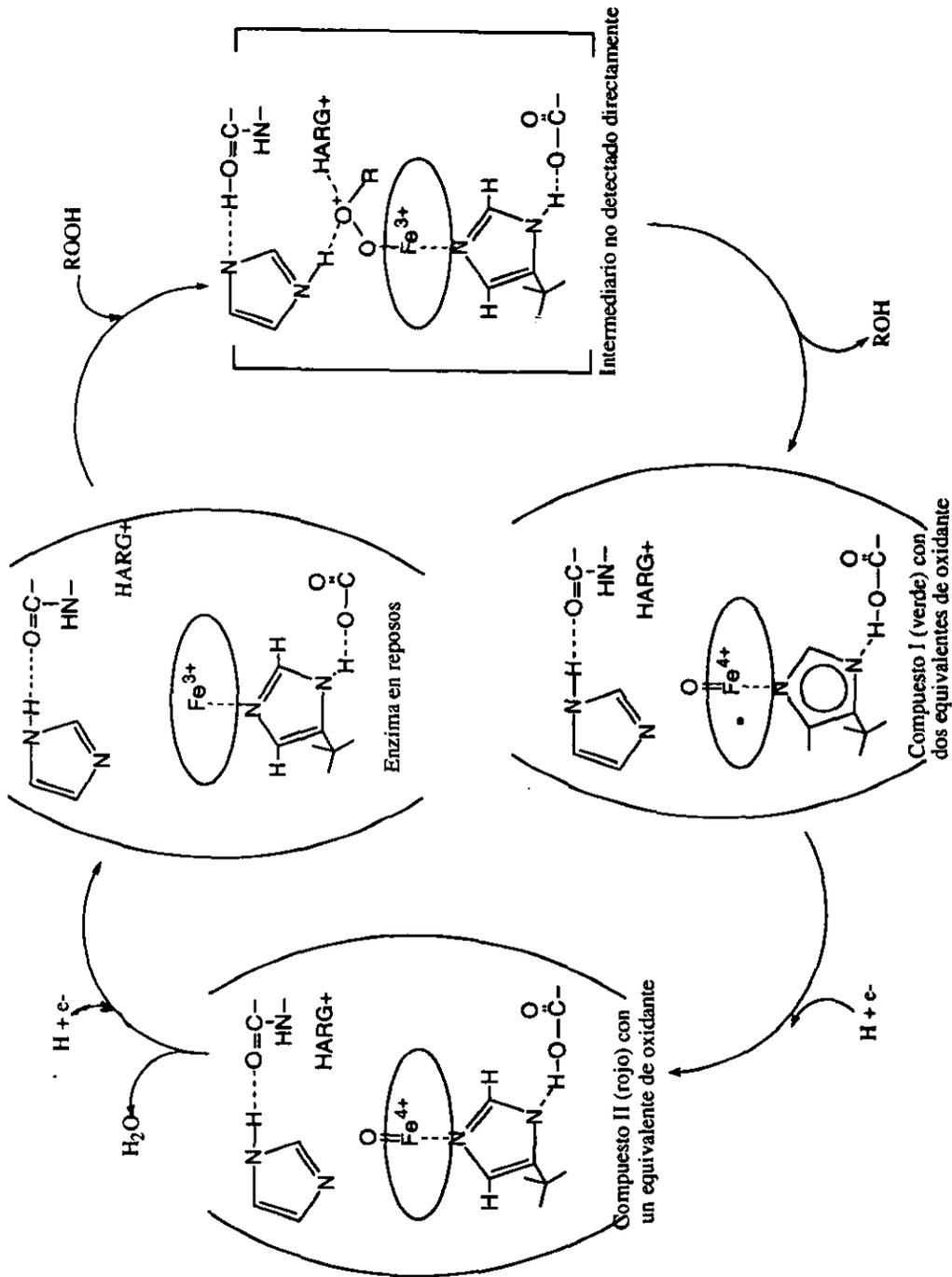


Figura 5. Mecanismo de la reacción de catálisis propuesto para la peroxidasa de rábano blanco.<sup>42</sup>

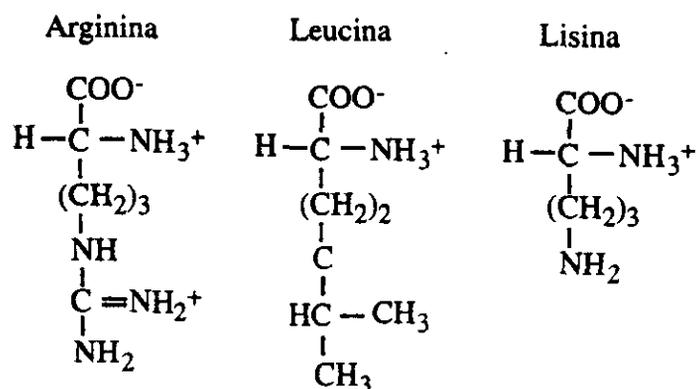


Figura 6. Diferencias estructurales de dos aminoácidos (Leu y Lys) que sustituyen a la arginina en la enzima *citocromo c peroxidasa* mutante provocando cambios en la velocidad de formación del Compuesto I.<sup>1,40</sup>

En la *mieloperoxidasa*, la aspargina421 está en lugar del aspartato235 de la *citocromo c peroxidasa de levadura*, indicando con esto que la aspargina puede estar en lugar del aspartato en el dominio proximal sin retardar la formación del Compuesto I. Sin embargo, la vibración de estiramiento del enlace Fe(II)-N(His), que es una prueba del enlace de hidrógeno proximal, tiene frecuencias similares (248 y 246  $\text{cm}^{-1}$ ) en Fe(II) de la *mieloperoxidasa* y la mutante I (MI)*citocromo c peroxidasa* y aparece a 205  $\text{cm}^{-1}$  en la mutante aspargina235, indicando que la histidina proximal no está enlazada por el hidrógeno en la mutante.<sup>40</sup> Este resultado indica que la presencia del imidazolato tiene otra función que la de acelerar la formación del Compuesto I.

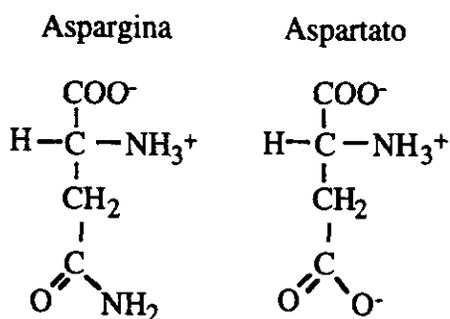


Figura 7. La diferencia de polaridades de los dos residuos de aminoácidos que están presentes en dos distintas peroxidases sin alterar su actividad catalítica, indicando que la histidina175 no interviene en el mecanismo de reacción como se pensaba.<sup>1,40</sup>

El intermediario común propuesto en el mecanismo de reacción de todas las peroxidases cuando funcionan como enzimas óxido-reductasas, es el Compuesto I (Figura 8), que se propone como radical  $\pi$ -catiónico con un estado basal  $^2A_{2u}$ . El espectro de

Mössbauer sugiere un espín entero para los compuestos modelo del Compuesto I.

De lo anterior se concluye que la enzima se oxida por dos electrones y que en esos intermediarios el hierro tiene un estado de oxidación alto.<sup>44, 43</sup>

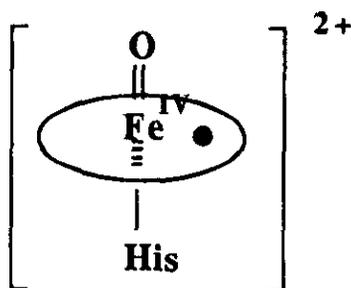
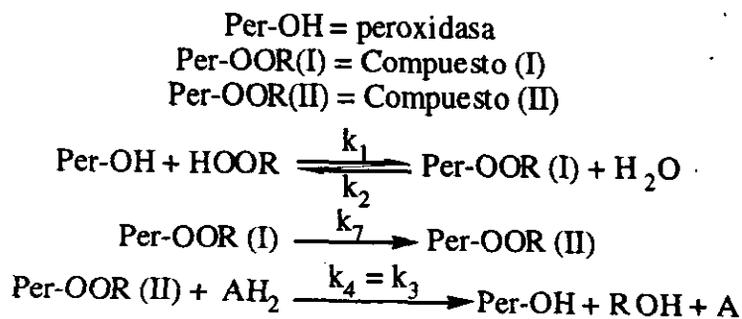


Figura 8. Estructura propuesta para el intermediario Compuesto I para el ciclo catalítico de las peroxidasas (óxido-reductasas) radical  $\pi$ -catiónico ferrilo o ferroxilo.<sup>42</sup>

Se han realizado estudios del intermediario Compuesto I (ferrilo o ferroxilo) a través de diferentes espectroscopías utilizando diferentes peroxidasas nativas y complejos modelo y se han observado resultados espectroscópicos que difieren unos de otros,<sup>44-50</sup> por lo que es necesario producir compuestos modelo del intermediario para ratificar o rectificar su existencia.

Con respecto a los primeros estudios cinéticos de la formación de los compuestos intermediarios (Compuestos I y II) que se forman en el ciclo catalítico de la peroxidasa de rábano blanco, fueron realizados por Chance en 1949.<sup>4</sup> Los valores de las constantes fueron, utilizando ácido ascórbico y peróxido de hidrógeno,  $k_1 = 0.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ;  $k_7 = 4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_4 = 1.2 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; con pH 4. Los resultados fueron resumidos de la siguiente manera\*:

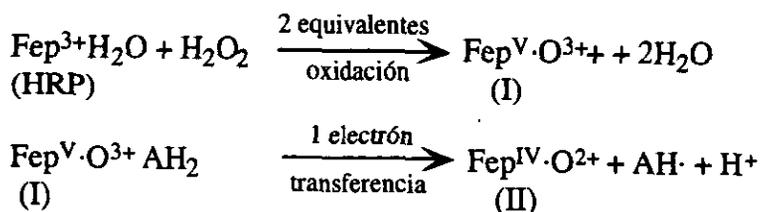


\*Notación original de Chance.

La reacción del compuesto per-OOR (II) con AH<sub>2</sub> fue considerada la etapa determinante de la velocidad de acuerdo a los valores reportados de las constantes. Así que el compuesto (II) per-OOR (II) fue el clásico complejo enzima-sustrato (E-S) del modelo enzimático de Michaelis y Menten,<sup>1</sup> aunque (II) no se descompone de una manera unimolecular puesto que se requiere de la participación del sustrato AH<sub>2</sub>.<sup>4</sup>

George no consideró completamente satisfactorio el esquema de Chance por diferentes razones, entre otras, que la transición del Compuesto I a Compuesto II era acelerada por agentes reductores, lo que hacía que esta reacción no pudiera ser unimolecular. Así mismo, demostró que el Compuesto II retornaba a ferriperoxidasa con un equivalente de agente reductor tal como iones ferroso, ferrocianuro o *ferrocitocromo c*.<sup>51</sup>

El esquema de George propuso se muestra a continuación:



La constante de equilibrio determinada para la formación del Compuesto I utilizando hidroperóxido de metilo fue de  $3.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ .

Una de las investigaciones más importantes fue la que realizaron Ator y Ortiz de Montellano<sup>52</sup> en la Universidad de California, San Francisco, en la que experimentalmente demostraron por qué la *peroxidasa de rábano blanco (horseradish)* durante la catálisis no intercala oxígeno en el sustrato que oxida. Incubaron *peroxidasa de rábano blanco* con fenilhidrazina y peróxido de hidrógeno disminuyendo la actividad catalítica de la enzima. Esta actividad desaparece cuando la enzima se aísla y se reincuba nuevamente con fenilhidrazina. El grupo hemo no reacciona con la fenilhidrazina para dar el complejo  $\sigma$  fenilhidrazina-Fe-porfirina como otras proteínas. Lo que sucede es que se convierte en los derivados porfirínicos  $\delta$ -meso-fenil y 8-hidroxi (Figura 9).

La pérdida de la actividad se debe más a la modificación de la proteína que a la del hemo, no obstante que la enzima inactiva reacciona con peróxido de hidrógeno para dar el

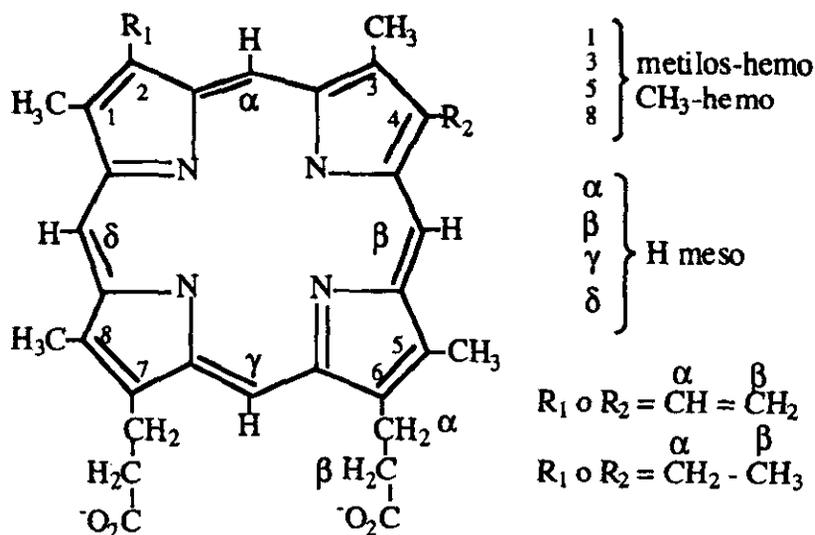


Figura 9. Designación de las posiciones de los sustituyentes en el anillo porfirínico.<sup>53</sup>

Compuesto I. El resultado implica que el sustrato interacciona con el hemo en lugar de reaccionar con el oxígeno activado de los Compuestos I y II. Específicamente se identifica la región de la enzima alrededor del carbón  $\delta$ -meso y del grupo metilo como el sector expuesto del grupo hemo. Esto llevó a concluir que la HRP no realiza reacciones de transferencia de oxígeno porque el oxígeno activado y el sustrato están separados físicamente por una barrera impuesta por la proteína.

Algunos compuestos modelo de peroxidasas sintetizados a partir de hierro-porfirinas, estudian el control que presentan estas hemo-proteínas sobre el número y el tipo de ligantes axiales en el grupo hemo. Este parámetro es muy importante puesto que determina el estado de oxidación y de espín del hierro y por consecuencia la función de la metaloproteína.<sup>5,34</sup> Los modelos cinéticos de peroxidasas que presentan actividad catalítica (generalmente no permanente<sup>54</sup>) producen mucha información sobre los sustituyentes axiales, proximales y distales en el sitio activo, acerca del mecanismo propuesto. Estos sustituyentes aumentan la estabilidad del hierro-hemo durante la catálisis, favorecen el flujo de densidad electrónica en un movimiento concertado de jalar y empujar (mecanismo *pull-*

*push*) y a la ruptura heterolítica del enlace O-O del peróxido, e impide la formación de radicales peroxilo por homólisis.<sup>55-60</sup>

Por otro lado, los estudios espectroscópicos de los complejos de Cu(II) permiten la determinación de sus estructuras electrónicas, de su diagrama de orbitales moleculares y conformación espacial.<sup>61-63</sup> En particular los estudios de UV-VIS<sup>64,65</sup> y ESR<sup>66,67</sup> de porfirinas-Cu(II), clorinas-Cu(II)<sup>62</sup> y otros complejos<sup>68</sup> han dado información del ambiente del metal, su configuración electrónica, grupo puntual de simetría, distorsiones estructurales, interacción superhiperfina con átomos segundos y terceros vecinos y el grado de covalencia de los enlaces metal-ligantes.<sup>3,61,62</sup> La información obtenida de los complejos de cobre(II) es complementaria para los modelos de peroxidasas, puesto que el hierro no da tanta información espectroscópica como lo hace el cobre.

## II.2 Parte experimental

II.2.1 Instrumentos, condiciones y materiales. Los espectros ópticos de los complejos utilizados y sintetizados se hicieron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-Vis-NIR 3100, en celdas de cuarzo de 3.5 mL, con un paso de luz de 1 cm, a una temperatura de 25 °C y en un rango de longitudes de onda de 220-700 nm. Las soluciones fueron en metanol con concentraciones de 0.1mM de cada muestra.

Los espectros de RMN de protón se obtuvieron en un espectrómetro BRUKER-DMX500 utilizando una sonda de detección inversa de cinco milímetros, a 500 MHz y se varió la temperatura. La amplitud de campo de -100 a +100 ppm. Referencia con tetrametilsilano-d<sub>12</sub> en soluciones de metanol deuterado 0.1 mM.

La espectroscopía de RPE se realizó en un espectrómetro Jeol modelo JES-RE3X, se utilizó banda X de microfrecuencia (aproximadamente 9.08 GHz) a la temperatura de nitrógeno líquido, en una amplitud de campo de 0-500 mT. Se utilizaron soluciones de metanol 0.1mM .

Tabla 2. Concentraciones [mM] para las mediciones de DCM de los complejos reportados en esta investigación

Complejo		Soret [mM]	Bandas Q [mM]
protoporfirina-Fe(III)	1	0.066	2.00
protoporfirina-Fe(III)-picdien	5		
mesoporfirina-Fe(III)	2	0.087	0.25
mesoporfirina-Fe(III)-picdien	6		
deuteroporfirina-Fe(III)	3	0.065	0.26
deuteroporfirina-Fe(III)-picdien	7		
clorina-Cu(II)	4	0.035	0.07
clorina-Cu(II)-picdien	8		

La espectropolarimetría magnética (DCM) se llevó a cabo en un espectropolarímetro JASCO modelo J-500A utilizando un campo magnético paralelo a la radiación de una intensidad constante de 0.4 T (4000 Gauss), en un rango de longitudes de onda de 300 a

650 nm y a una temperatura de 25°C, con una sensibilidad de 2 miligrados  $\text{cm}^{-1}$  y una escala de 10 nm/cm. Se utilizaron las concentraciones para el Soret y para las bandas Q indicadas en la Tabla 2.

La protoporfina IX, mesoporfirina IX, protohemina, clorina-Cu(II) y el resto de los reactivos utilizados se adquirieron comercialmente (Aldrich).

## II.2.2 Metodología

II.2.2.1 Obtención de protohemina. (1) La protohemina es la cloroprotoporfirina IX-hierro(III), se obtuvo de sangre de carnero por el método de Theatle.<sup>69</sup> Se utilizó 0.5 L de sangre de carnero esterilizada y se sometió a centrifugación (5000 rpm) durante cinco minutos para separar el paquete globular del suero. Posteriormente se decantó. El paquete globular se lavó con una solución salina (0.15 M) isotónica hasta que ya no tuvo coloración, y se sometió a diálisis por 48 horas en agua destilada. Se cambió el disolvente cada quince horas, en una relación de 1 volumen de paquete globular por 60 volúmenes de agua. La hemoglobina obtenida se filtró sobre papel whatman GF/D y se disolvió en agua, ajustando el pH a 2.5 con HCl concentrado para separar la apoproteína del grupo hemo. Posteriormente se hizo una extracción con metiletilcetona que disuelve específicamente la protoporfirina IX-Fe(III). Se evaporó el disolvente y la pasta se dejó secar. Se obtuvieron 0.5 g de protohemina-hierro(III) (1) como un polvo café oscuro. La protoporfirina que se obtiene directamente de la proteína como en este caso está clorada en la quinta posición, metalada con hierro(III) y tiene los ácidos propiónicos periféricos libres. Para obtener los ésteres dimetílicos de la protohemina, se disolvió en una mezcla de metano/cloroformo (1:1) y se le burbujeó HCl gaseoso con agitación fuerte por 1 hora al cabo de la cual la solución se mezcló con 100 mL de agua y se colocó dentro de un embudo de separación. Se separó la capa de cloroformo y se lavó repetidas veces con agua y otras tantas con una solución de amoníaco. Se secó la disolución de cloroformo con sulfato de sodio anhidro y posteriormente se filtró la mezcla. Se redujo el volumen de disolvente y se le agregó metanol. La disolución se dejó reposar hasta la cristalización de la protoporfirina. UV-Vis con  $\lambda$  de 400.2, 510.0, 538.2, 572.8, 640.0, nm. RMN de <sup>1</sup>H,  $\delta$  = 9.96, 9.95, 9.83 y 9.82 (4 H-meso), 4.17, 3.10, 3.59, (4 CH<sub>2</sub>-prop), 3.53 (2 1,3-Me-hemo), 3.65 (2 Me-ester), 3.62 (2 5,6-Me-hemo), 3.34, 3.30, 3.26 (4 CH<sub>2</sub>-prop), -4.3 (H-N), en ppm.

II.2.2.2 Obtención de cloroprotoporfirina IX-hierro(III) éster dimetílico a partir de la porfirina desmetalada (1). Se utilizó el método de Lamberg, Morell y colaboradores para

la metalación de porfirinas.<sup>70</sup> A partir de 30 mg (0.052 mmoles) de protoporfirina IX que se disolvieron en 1 mL de piridina y se diluyeron con 10 mL de ácido acético glacial, se le agregó 1 mL de una solución acética de sulfato ferroso. La mezcla de reacción se agitó durante diez minutos a 80 ° C y en atmósfera de nitrógeno. Pasado el tiempo de reacción se destapó la mezcla y se dejó agitar al aire por diez minutos más para que se llevara a cabo la autooxidación del metal. Se agregó éter para quitar la porfirina residual. Se extrajo la metalada por adición de una solución de HCl al 25% (p/v). Se secó el éter sobre sulfato de sodio anhidro. Se evaporó y se obtuvieron 29 mg (0.067 mmoles) de producto (82.7% de rendimiento). SeUV-Vis con  $\lambda_{\text{máx}}$  en 397.4, 498 y 615.0 nm. DCM con  $\lambda_{\text{Soret}}$  385.86-403.77 nm y  $[\theta]_{\text{M Soret}}$  (-5, 488.37)-(-16, 139.53) grad cm<sup>-1</sup> dmol G<sup>-1</sup>,  $\lambda_{\text{Q}}$  545.29-607.55 nm y  $[\theta]_{\text{M Q}}$  (545.29)-(607.55) grad cm<sup>-1</sup> dmol G<sup>-1</sup>. RMN de <sup>1</sup>H  $\delta$  = 71.39, 70.46, 66.93, 62.03 (4 Me-hemo: 8, 5, 3, 1), 51.61 ( $\alpha$ -CH vinilo), 51.61 ( $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 47-47.6 (meso-H). RPE para Fe(III) con un espectro axial para la especie A con  $g_{\parallel}^{\text{A}} = 1.924$  and  $g_{\perp}^{\text{A}} = 5.403$ . Especie B<sub>1</sub> con un espectro axial con  $g_{\parallel}^{\text{B}} = 1.924$  and  $g_{\perp}^{\text{B}} = 4.000$  y una tercera especie axial C<sub>1</sub> con  $g_{\parallel}^{\text{C}} = 7.955$  and  $g_{\perp}^{\text{C}} = 4.000 \pm 0.008$  y una especie de bajo espín D<sub>1</sub> con  $g = 2.0$ .

*II.2.2.3. Obtención de cloromesoporfirina-IX-hierro(III) éster dimetílico (2).* El método utilizado es el de Lamberg,<sup>70</sup> exactamente el mismo que para la obtención de cloroprotoporfirina IX-hierro-(III). Se utilizaron 20 mg (0.034 mmoles) de mesoporfirina desmetalada y se obtuvieron 19 mg (0.029 mmoles) de producto final (83.3% de rendimiento). UV-Vis con  $\lambda_{\text{máx}}$  en 377.2, 485.6, 593.0 nm. DCM con  $\lambda_{\text{Soret}}$  376.92-496.15 nm y  $[\theta]_{\text{M Soret}}$  (-2, 696.63)-(-20, 224.71) grad cm<sup>-1</sup> dmol G<sup>-1</sup>,  $\lambda_{\text{Q}}$  540.38-601.91 nm y  $[\theta]_{\text{M Q}}$  (-5, 656.56)-(-404.04) grad cm<sup>-1</sup> dmol G<sup>-1</sup>. RMN de <sup>1</sup>H,  $\delta$  = 62.98, 62.98, 61.17, 60.39 (Me-hemo: 1, 3, 5, 8), 34.40 ( $\alpha$ -CH<sub>2</sub>) ppm. En RPE mostró dos señales A<sub>2</sub> and B<sub>2</sub> with and  $g_{\perp}^{\text{A}} = 4.890$   $g_{\perp}^{\text{B}} = 3.992$ .

#### *II.2.2.4 Obtención de clorodeuteroporfirina-IX-hierro(III) éster dimetílico (3). Se*

utilizó el método de Adler<sup>71</sup>. Se mezclaron 1 g (1.6 mmoles) de protohemina con 5 g de resorcinol y se calentaron a 190-200 °C por 20 minutos. Después la mezcla de reacción se enfrió a 140 °C y se adicionaron 10 mL de ácido propiónico caliente con agitación vigorosa. La mezcla resultante se vertió en 50 mL de agua y se neutralizó con una solución concentrada de NaOH, la deuteroporfirina-hierro(III) precipitó mezclada con protohemina.

Para purificar la deuteroporfirina-hierro(III) se procedió a desmetalarla, por lo que se disolvió en una mezcla de 80 mL de metanol y 80 mL de cloroformo.

Por otro lado, se prepararon 5 g de sulfato ferroso anhidro que se adicionaron a la mezcla de deuteroporfirina-hierro(III) y hemina de la reacción anterior, a la cual se le burbujeó HCl gaseoso con agitación fuerte por 1 hora al cabo de la cual la solución se mezcló con 100 mL de agua y se colocó dentro de un embudo de separación. Se separó la capa de cloroformo y se lavó repetidas veces con agua y otras tantas con una solución de amoníaco.

Finalmente la solución de cloroformo se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se llevó a una columna de cromatografía con alúmina neutra. La columna se montó con cloruro de metileno. Posteriormente se utilizó una mezcla de acetona-cloruro de metileno 95:5 para sacar la deuteroporfirina desmetalada de color cereza. Se redujo el volúmen de eluyente y se le agregó metanol. La disolución se dejó reposar hasta la cristalización de la deuteroporfirina. Se obtuvieron 0.73 g (1.4 mmoles) del dimetiléster de deuteroporfirina (92.6 % de rendimiento). UV-Vis con  $\lambda$  de 395.4, 496.8, 531.4, 565.2, 618.2 nm. RMN de <sup>1</sup>H,  $\delta$  = 10.17, 10.13, 10.09, 10.05 (4 H-meso), 9.13, 9.12, 9.11, 9.10 (2 H-2,4-hemo), 4.48, 4.44, 4.40 (4 CH<sub>2</sub>-prop), 3.77, 3.76, 3.74, 3.73, 3.67, 3.66, 3.65, 3.64 (6 Me-hemo, 2 Me-éster), 3.34, 3.30, 3.26 (4 CH<sub>2</sub>-prop), -3.8 (H-N), en ppm.

Posteriormente se hizo la metalación de la deuteroporfirina por el método de

Lamberg<sup>70</sup> a partir de 0.019 g de deuteroporfirina (0.033 mmoles) y se obtuvieron 0.012 g (0.022 mmoles) del complejo **2** (66.6 % de rendimiento). UV-Vis con  $\lambda$  en 386.5, 488.0, 589.0 nm. DCM con  $\lambda_{\text{Soret}}$  382.69-390.38nm y  $[\theta]_{\text{M Soret}}$  (+5, 825,24)-(-51, 262.11) grad  $\text{cm}^{-1} \text{dmol G}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{Q}}$  536,53-591.33nm y  $[\theta]_{\text{M Q}}$  (-7, 660.82)-(-233.92) grad  $\text{cm}^{-1} \text{dmol G}^{-1}$ . RMN de  $^1\text{H}$  con  $\delta = 74.60, 71.02, 66.57, 61.97$  (Me-hemo: 8, 5, 3, 1), 45-48.5 ( $\alpha\text{-CH}_2$ ), 37-38.79 (meso-H) ppm. El espectro de RPE con tres señales  $g_3^A = 5.137$ ,  $g_3^B = 4.117$  and  $g_3^C = 2.316$ .

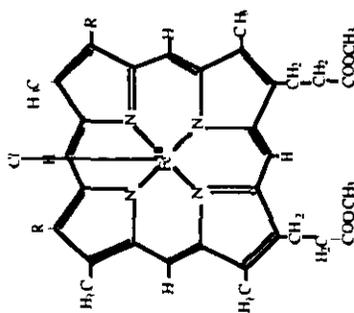
*II.2.2.5 Obtención de 1,9-bis(2-piridil)-2,5,8, triazonano (picdien).* Se utilizó el método de Ahmed.<sup>70</sup> Se colocaron 50 g de Zn en polvo, 12.4 g de dietiléntriamina y 50 mL de ácido acético glacial en un matraz de tres bocas provisto con un agitador mecánico y un embudo de adición. Todo se disolvió en metanol (250 mL). La mezcla se agitó vigorosamente y se calentó entre 70 y 80 ° C. Se le fue adicionando lentamente (en un tiempo de 1.5 horas) una disolución de 26.8 g de 2-piridincarboxialdehído en 150 mL de metanol. Posteriormente se adicionaron varias porciones de Zn hasta un total de 100g y 100 mL de ácido acético, se mantuvo la agitación y temperatura por cinco horas. La mezcla de reacción se dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente, y se filtró para eliminar el Zn en exceso y el acetato de cinc. Se obtuvo un líquido amarillo que al evaporarse se volvió muy denso. Se lavó varias veces con acetona, se filtró y evaporó para eliminar completamente el precipitado de cinc. Se neutralizó la mezcla final con hidróxido de sodio y se dejó reposar toda la noche en contacto con las lentejas de hidróxido de sodio. El producto crudo se disolvió en un mínimo de acetona y se purificó por cromatografía en columna de sílica utilizando acetona como eluyente. Se obtuvieron 20.6 g del producto puro (60% de rendimiento). UV-Vis con  $\lambda_{\text{máx}}$  en 265.5 nm. RMN de  $^1\text{H}$ ,  $\delta = 8.47$  (*m* 2 H-piridina), 7.75-7.80 (*m* 2 H-piridina), 7.30-7.46 (*m* 4-H piridina), 3.91 (*s* 4 H- $\text{CH}_2$ ), 2.74 (*t* 6 H- $\text{CH}_2$ ), 1.80 (*q* 2 H- $\text{CH}_2$ ) en ppm.

*II.2.2.6 Obtención de los complejos protoporfirina-hierro(III)-picdien (5-7).* Este

procedimiento ilustra toda la serie. Se disolvieron 131.2 mg.(0.20 mmol) de **1** en 30 mL de metanol absoluto y se le agregaron 62.7 mg (0.22 mmol) de picdien. Se agitó la mezcla de reacción por seis horas para que la reacción fuera total. La evolución de la reacción se siguió por RMN de  $^1\text{H}$  y RPE hasta que las bandas que caracterizan a estos productos ya no presentaron modificaciones ni de posición ni de intensidad. Se hicieron las determinaciones en una muestra del complejo disuelta en metanol deuterado a las concentraciones reportadas y se tomaron espectros cada media hora. En cuanto a la espectroscopía de RPE, se hizo lo mismo y se tomaron espectros primero cada diez minutos durante la primera hora y después cada media hora hasta que las señales no cambiaron. Para la *protoporfirina-Fe(III)-picdien* (**5**) el tiempo de reacción fué de 5 horas. Se evaporó el metanol y el residuo rojo oscuro se disolvió en cloroformo. Se probaron distintos sistemas de disolventes, sin éxito, para obtener un sólido. UV-Vis con  $\lambda_{\text{máx}}$  en 262.0 (picdien), 358 (hombro), 399.4, 486.0, 593.8 nm. DCM con  $\lambda_{\text{Soret}}$  394.35-411.32 nm y  $[\theta]_{\text{M Soret}}$  (-4, 534.88)-(-1, 162.79) grad  $\text{cm}^{-1}$  dmol  $\text{G}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{Q}}$  547.55-593.40 nm y  $[\theta]_{\text{M Q}}$  (-814.00)-(+439.00) grad  $\text{cm}^{-1}$  dmol  $\text{G}^{-1}$ . RMN de  $^1\text{H}$ ,  $\delta = 42.21, 42.21, 38.71, 37.93$  (4 Me-hemo), 35.67 ( $\alpha\text{-CH}_2$ ), -35.05 (meso-H) ppm. RPE muestra dos especies axiales  $A_4$  and  $B_4$  con  $g_{\parallel}^A = 1.990$  y  $g_{\perp}^A = 5.172$ ,  $g_{\parallel}^B = 1.951$  y  $g_{\perp}^B = 4.072$ . Para la *mesoporfirina-Fe(III)-picdien* (**6**) se disolvieron 137 mg (0.2 mmoles) de **3** en 30 mL de metanol y se le agregaron 62.7 mg (0.22 mmoles) de picdien. El tiempo de reacción fué de 6 horas. Se evaporó el metanol y el residuo rojo intenso se disolvió en éter etílico. Se probaron distintos sistemas de disolventes para obtener un sólido, sin éxito. UV-Vis con  $\lambda_{\text{máx}}$  en 342.5, 388.0, 480.0, 584.0 nm. DCM con  $\lambda_{\text{Soret}}$  384.61-507.69 nm y  $[\theta]_{\text{M Soret}}$  (-3, 146.07)-(-14, 606.74) grad  $\text{cm}^{-1}$  dmol  $\text{G}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{Q}}$  540.38-592.30 nm y  $[\theta]_{\text{M Q}}$  (-5,333.33)-(+969.70) grad  $\text{cm}^{-1}$  dmol  $\text{G}^{-1}$ . RMN de  $^1\text{H}$ ,  $\delta = 40.34, 40.34, 39.13, 39.13$  (4 Me-hemo), 33.59 ( $\alpha\text{-CH}_2$ ), -33.35 (meso-H) ppm. RPE con dos especies axiales  $A_5$  and  $B_5$  with  $g_{\parallel}^A = 1.987$ ,  $g_{\perp}^A = 5.222$  y  $g_{\parallel}^B = 1.953$ ,  $g_{\perp}^B = 4.067$ . Para la *deuteroporfirina-Fe(III)-picdien* (**7**) se disolvieron 139 mg (0.2 mmoles) de **3** en 30

mL de metanol absoluto, y se adicionaron 62.7 mg (0.22 mmoles) de picdien. El tiempo de reacción fué de 5.5 horas. Se evaporó el disolvente y el residuo rojo cereza se disolvió en éter etílico. Se probaron distintos sistemas de disolventes para obtener un sólido, sin éxito. UV-Vis con  $\lambda_{\text{máx}}$  en 262.5 (picdien), 344.5 (hombro), 387.4, 479.8, 590.0 nm. DCM con  $\lambda_{\text{Soret}}$  382.69-401.92 nm y  $[\theta]_{\text{M Soret}}$  (+2, 912.62)-(-53, 009.68) grad cm<sup>-1</sup> dmol G<sup>-1</sup>,  $\lambda_{\text{Q}}$  536.53-584.60 nm y  $[\theta]_{\text{M Q}}$  (-7, 134.50)-(+2, 339.18) grad cm<sup>-1</sup> dmol G<sup>-1</sup>. RMN de <sup>1</sup>H,  $\delta$  = 39.62, 39.62, 38.25 y 33.59 (4 Me-hemo), 76.40 (2,4-H), 33.59 ( $\alpha$ -CH<sub>2</sub>). RPE con dos especies axiales A<sub>6</sub> and B<sub>6</sub> and con  $g_{\parallel}^{\text{A}_6} = 1.957$ ,  $g_{\perp}^{\text{A}_6} = 5.238$  y  $g_{\parallel}^{\text{B}_6} = 1.957$ ,  $g_{\perp}^{\text{B}_6} = 4.100$  y una señal C con  $g_{\text{iso}} = 2.000$ . Para la *clorina-Cu(II)-picdien* **8** se disolvieron 144 mg (0.2 mmoles) de clorofilina en 30 mL de metanol absoluto se agregaron a la mezcla 62.7 mg (0.22 mmoles) de picdien. El tiempo de reacción fue de 5.0 horas y no se obtuvo precipitado. UV-Vis con  $\lambda_{\text{máx}}$  en 262.00 (picdien), 404.60, 465, 552.8, 628.8 nm. DCM con  $\lambda_{\text{Soret}}$  375.00-407.69 nm y  $[\theta]_{\text{M Soret}}$  (-28, 800)-(+99, 200) grad cm<sup>-1</sup> dmol G<sup>-1</sup>,  $\lambda_{\text{Q}}$  555.76-626.91 nm y  $[\theta]_{\text{M Q}}$  (+1, 000)-(-44, 000) grad cm<sup>-1</sup> dmol G<sup>-1</sup>. RMN de <sup>1</sup>H,  $\delta$  = 8.58, 7.8, 7.43 (aromáticos del picdien), 4.9, 4.1, 3.5, 2.9, 2.2, 1.8 (sin designación) ppm. Por RPE  $g_{\parallel} = 2.170$  y  $g_{\perp} = 2.046$ .

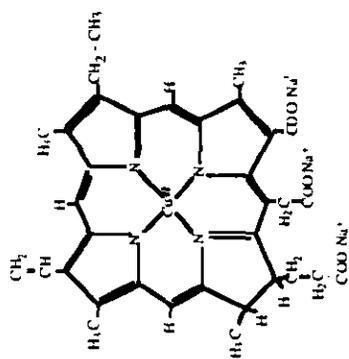
A continuación se presenta un diagrama de flujo de la metodología empleada en la presente investigación.



R = CH = CH<sub>2</sub>, cloruro de protoporfirina IX-hierro(III) éster dimetilico 1.

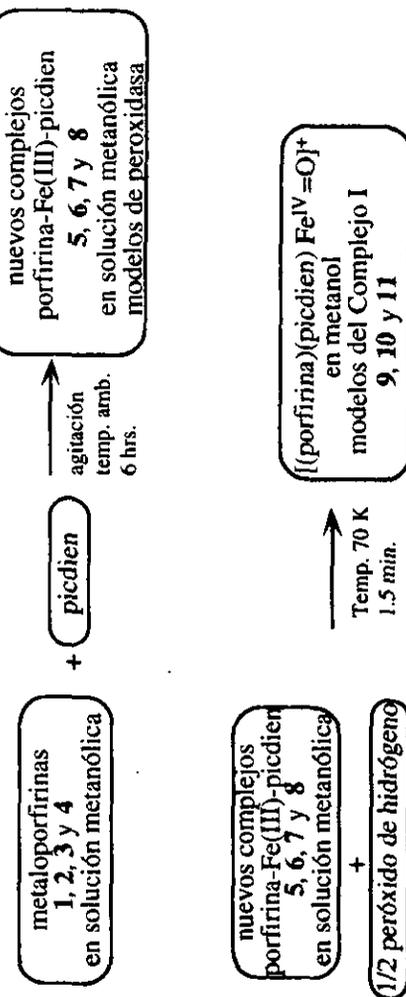
Para R = CH<sub>2</sub> - CH<sub>3</sub>, cloruro de mesoporfirina IX-hierro(III) éster dimetilico 2.

Para R = H; cloruro de deuterotoporfirina IX-hierro(III) éster dimetilico 3.



Clorina-Cu(II) o clorofitina

Diagrama de las reacciones de obtención de los nuevos complejos que se reportan en este trabajo:



### II.3 Caracterización espectroscópica de los complejos de Fe(III) obtenidos. Resultados, discusión y conclusiones

#### II.3.1 Ultravioleta-Visible.

Resultados. En la Figura 10 se presenta el espectro típico de UV-Vis de uno de los complejos sintetizados en esta investigación: protoporfirina-Fe(III)-picdien **5**, contrastando con el de su precursor: protoporfirina-Fe(III) **1**.

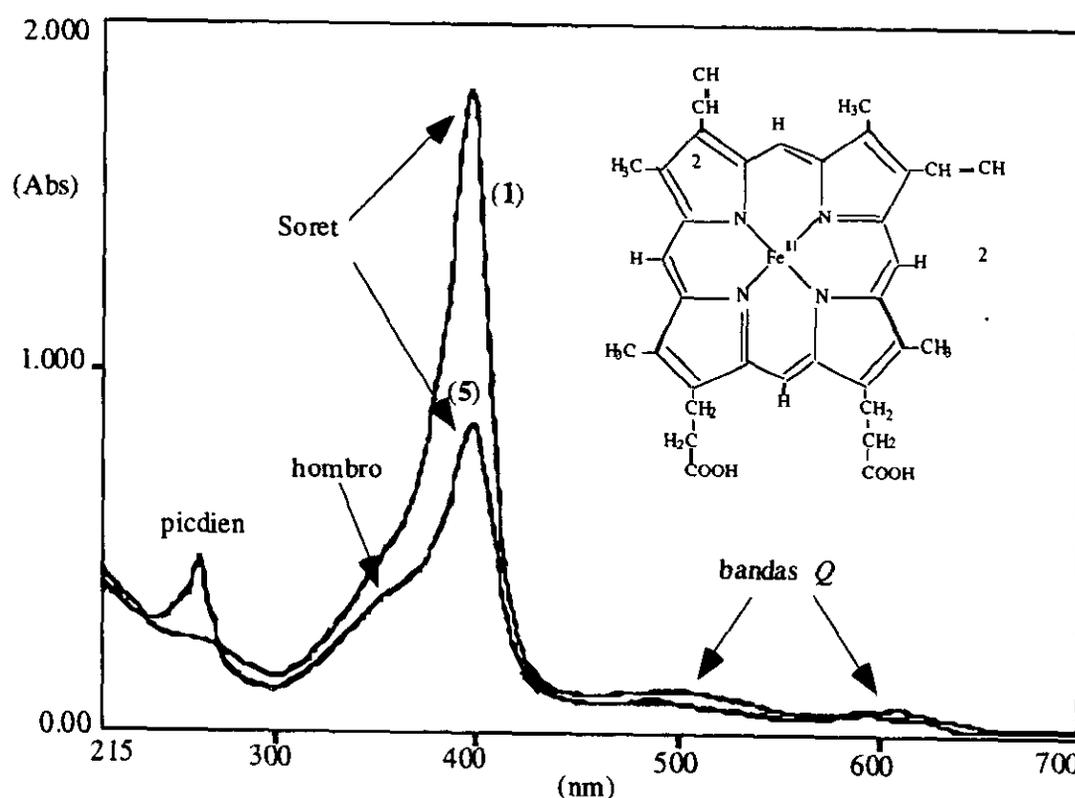


Figura 10. Espectros de UV-Vis de los complejos protoporfirina-Fe(III)-picdien (**5**) y su precursor protoporfirina-Fe(III) (**1**).

En la Tabla 3 se resume la información obtenida de los espectros de UV-Vis de los complejos porfirinas-Fe(III)-picdien y de sus complejos precursores, obtenidos en este trabajo.

En general, las bandas que presentan los espectros de UV-Vis de los complejos **1-3** y **5-7** que se reportan en este trabajo son características de este tipo de compuestos: una muy

intensa alrededor de los 400 nm llamada banda de Soret y en este caso dos en la región ~ 480-615 nm llamadas bandas  $Q$ . Los espectros de UV-Vis de los otros complejos obtenidos 6 y 7 (apéndice 1) son muy semejantes al de la Figura 10.

Tabla 3. Posición de las bandas que se observaron en los espectros de UV-Vis de los complejos de porfirina-hierro(III) and porfirina-hierro(III)-picdien

Porfirina-Fe(III)		Hombro nm	Soret nm	Banda $Q_1$ nm	Banda $Q_2$ nm	$\Delta(Q_1-Q_2)$ nm
Protoporfirina-Fe(III)	(1)		397	498	615	117
Protoporfirina-Fe(III)-picdien	(5)	358	399	486	594	108
Mesoporfirina-Fe(III)	(2)		377	486	593	107
Mesoporfirina-Fe(III)-picdien	(6)	343	388	480	584	104
Deuteroporfirina-Fe(III)	(3)		387	488	589	101
Deuteroporfirina-Fe(III)-picdien	(7)	345	387	480	590	110

Para los complejos porfirinas-picdien 5-7 la posición de las bandas cambia, y baja la intensidad de su absorción, respecto de sus precursores (hierroporfirinas libres de picdien 1-3). Las bandas de Soret están en 399, 388 y 388 nm para 5-7 respectivamente. Las bandas  $Q$  para el complejo 5 están en 498 y 594 nm, para el compuesto 6 en 480 y 584 nm y para el complejo 7 en 480 y 590 nm. Las dos bandas  $Q$  son características de una simetría  $D_{4h}$  con cierta distorsión en la medida en la que el hierro(III) esté más o menos cercano del plano de la porfirina.<sup>26,27,71,72</sup> Estos mismos complejos muestran un hombro en 358, 342.5 y 344.5 nm el cual no está presente en los compuestos precursores 1-3 pero que se observa a pH ~ 7 en los espectros de UV-Vis de algunas enzimas reportadas.<sup>6,10</sup>

Para los complejos 1-3 y 5-7, los espectros de UV-Vis son semejantes a los reportados para estas porfirinas-Fe(III) de espín  $S = 5/2$ .<sup>28,29,73,74</sup>

Discusión. Para llevar a cabo la discusión de los resultados obtenidos de la espectroscopía de UV-Vis para los complejos reportados en este trabajo (1-3 y 5-7), se empezará por considerar del trabajo de Gouterman<sup>74</sup>, que en una porfirina desmetalada el espectro de absorción de UV-Vis está determinado esencialmente por los 18 electrones  $\pi$  del anillo porfirínico y sus transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$ , presentando una banda intensa llamada B o de Soret que está en la vecindad de los 400 nm, y cuatro bandas que tienen una intensidad diez veces menor que el Soret llamadas bandas Q que se encuentran repartidas entre 500-650 nm. Cuando la porfirina se metala, la posición, la intensidad y el número de bandas Q cambian de acuerdo con el metal, su estado de oxidación y de espín, los cuales determinan la simetría de la molécula.<sup>28</sup>

En la Figura 11 se observa cómo se rompe la degeneración de los orbitales  $d$  del hierro al descender la simetría, por lo que pueden suceder un mayor número de transiciones electrónicas.<sup>29</sup>

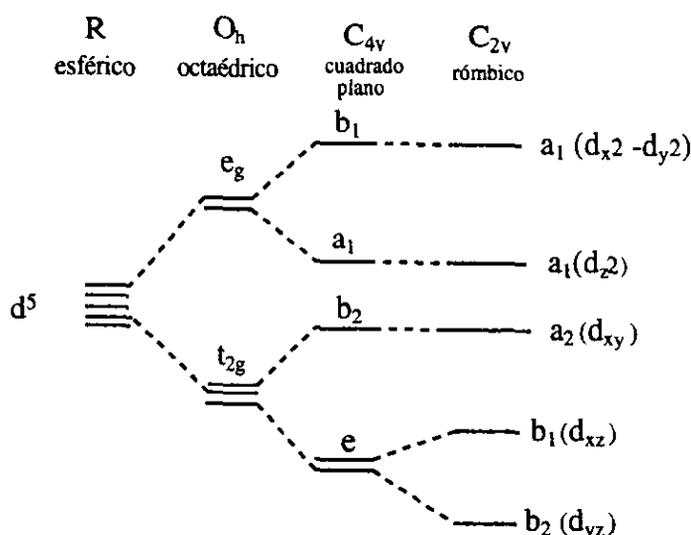


Figura 11. Pérdida de la degeneración de los orbitales  $3d$  para el ion  $Fe(III)$  bajo la influencia de diferentes simetrías moleculares.<sup>29</sup>

El cálculo teórico de Zerner, Gouterman y Kobayashi<sup>28</sup> reporta que las bandas que presentan las porfirinas se deben a las transiciones  $a_{1u}(\pi)$ ,  $a_{2u}(\pi) \rightarrow e_g^*(\pi)$ , que siendo cercanas en energía se mezclan por las interacciones electrónicas. Existen dos estados excitados

resultantes, el estado Q de baja energía en el cual las transiciones dipolares del orbital básico casi se cancelan, y el estado de alta energía B (Soret) en el que las transiciones dipolares se suman.

En la Figura 12 se presentan los diagrama de OM derivados del cálculo por el método de Hückel para la mioglobina (b) y para el *citocromo-b5* con Fe(III) alto espín y con un estado base  ${}^6A_{1g}$ . En el caso de la mioglobina se hizo con la protoporfirina pentacoordinada con cloruro y para el *citocromo-b5* se hizo para una hexacoordinación del Fe(III) con piridinas.<sup>73</sup>

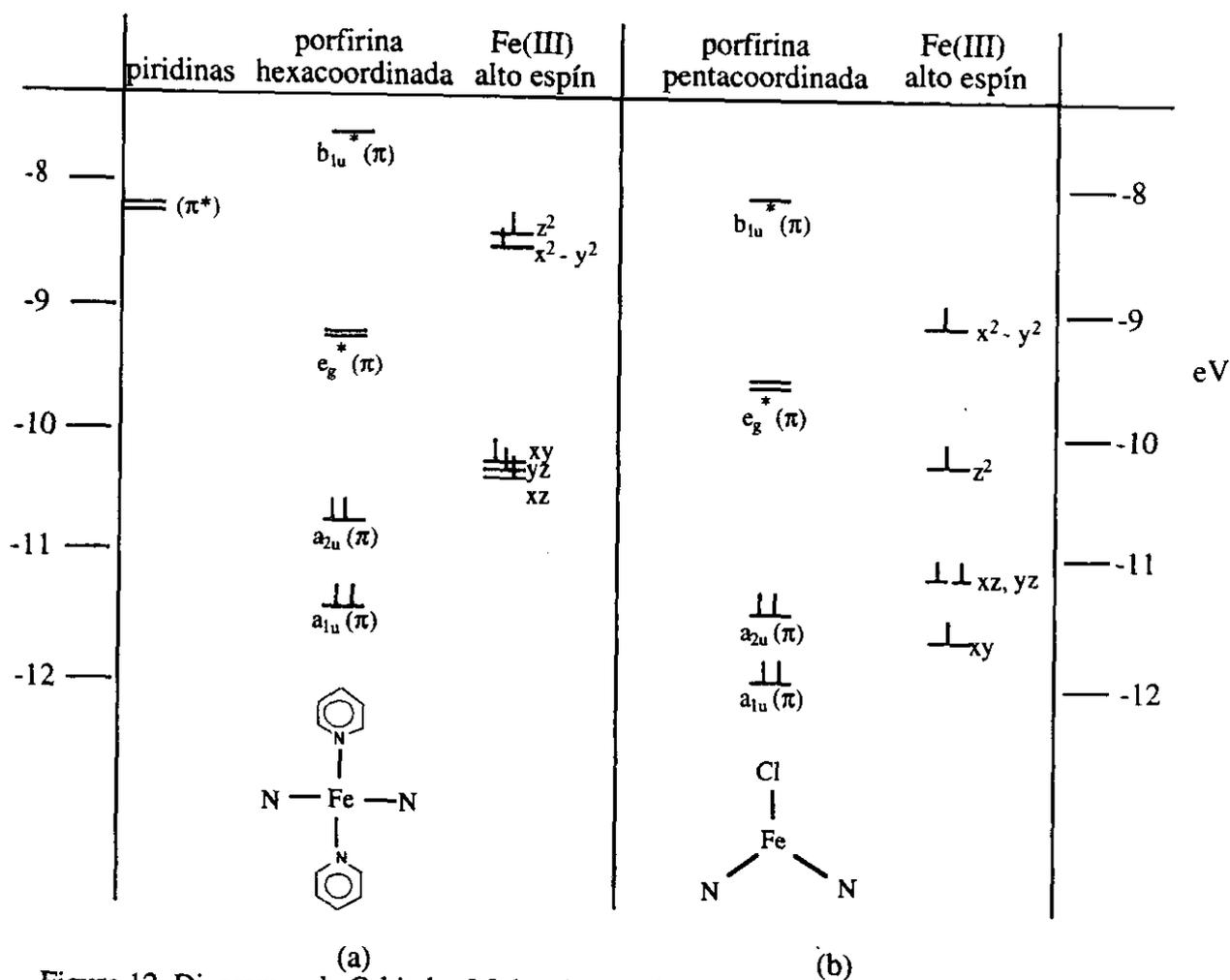


Figura 12. Diagramas de Orbitales Moleculares calculados por el método de Hückel para la hemoglobina-Fe(III) y *citocromo-b5*.<sup>73</sup>

Si no hay ligantes adicionales el primer OM vacío  $e_g^*(\pi)$  (LUMO) desdobra su degeneración por no más de  $2 \text{ cm}^{-1}$ . El análisis de ese OM indica que es construido por orbitales básicos de simetría  $\pi$  y nunca tiene más de 3 por ciento de OA  $3d_\pi$  del metal.<sup>30</sup>

El OM más alto en energía lleno  $a_{1u}(\pi)$  -con nodos a través de los puentes metinos de la porfirina y a través de los cuatro nitrógenos de la misma- no puede mezclarse con ninguno de los orbitales base del metal. El promedio del dipolo para la transición  $a_{1u}(\pi) \rightarrow e_g^*(\pi)$  se estima en  $2.2 \text{ \AA}$  y solamente varía por  $0.02 \text{ \AA}$  para todos los casos considerados.<sup>30</sup>

Los resultados obtenidos de la espectroscopía de UV-Vis para los nuevos complejos obtenidos en esta investigación, porfirinas-Fe(III)-picdien (5-7) presentados en la Tabla 3 (página 29), muestran que la reubicación de las bandas de Soret y Q que diferencian a las porfirinas de partida hexa-coordinadas con cloruro y metanol de las porfirinas-Fe(III)-picdien, están de acuerdo con los modelos teóricos de la Figura 12. Se observa que las tres bandas de cada espectro de los complejos con picdien (5-7) se acercan quedando en intervalos de energías más cortos que para las porfirinas precursoras (1-3). Esto permite proponer una posible hexa-coordinación de los dos piridilos del picdien al hierro en las porfirinas iniciales (1-3) penta-coordinadas con cloruro.

La concordancia de los resultados experimentales obtenidos en la Tabla 3 con la teoría (Figura 12) se tiene también en la posición de las bandas de Soret para cada uno de los complejos porfirina-Fe(III)-picdien (5-7), a energías no mayores que para las porfirinas-Fe(III) iniciales (1-3).

Con respecto a la simetría de los derivados de hierro-porfirinas, si la hemina es hexa-coordinada con los ligantes iguales en quinta y sexta posición tiene una simetría  $D_{4h}$  con un

OM Porphirina	Metal
$x, y \begin{cases} a_{2u}(\pi), a_{1u}(\pi) \\ b_{2u}(\pi), a'_{2u}(\pi) \end{cases}$	$x, y \begin{cases} e_g(d\pi) \end{cases}$
$z \begin{cases} a_{2u}(\pi), a'_{2u}(\pi) \end{cases}$	$z \begin{cases} a_{1g}(dz^2) \end{cases}$
$z \begin{cases} b_{2u}(\pi) \end{cases}$	$z \begin{cases} b_{1g}(d_x^2 - d_y^2) \end{cases}$

Figura 13. OM porfirínicos y OA  $d$  del metal presentes en una simetría  $D_{4h}$ .<sup>28</sup>

arreglo octaédrico distorsionado, dependiendo del estado de espín del Fe(III) (Figuras 13 y 14).<sup>8,28,73,74</sup>

El Fe(III) con cinco electrones en la última capa,  $3d$ , ( $d^5$ ) puede existir en cinco estados de espín: 1) Sexteto puro  ${}^6A_1$  (alto espín,  $S = 5/2$ ); 2) doblete puro  ${}^2T_2$  (bajo espín,  $S = 1/2$ ); 3) cuarteto puro  ${}^4T_1$  (espín intermedio,  $S = 3/2$ ); 4) mezcla térmica de los estados  ${}^6A_1$ ,  ${}^2T_2$  (espín mezclado térmicamente,  $S = 5/2$ ,  $S = 1/2$ )<sup>59</sup> y 5) mezcla cuántica de los estados  ${}^6A_1$ ,  ${}^4T_1$  (espín mezclado cuánticamente,  $S = 5/2$ ,  $S = 3/2$ ).<sup>6,9</sup> (Figura 14).

Las proteínas que contienen hemo-Fe(III) y muchos de los derivados del hemo tienen un comportamiento espectroscópico característico de un estado puro de espín sexteto  ${}^6A_1$  o de un doblete  ${}^2T_2$  puro; sin embargo, las enzimas peroxidasa pueden presentar también un comportamiento espectroscópico distinto de los anteriores que se asocia con un estado de espín mezclado cuánticamente  $3/2$ ,  $5/2$ .<sup>5,8,73</sup> Este último estado de espín se ha obtenido en complejos de porfirinas-Fe(III) que tienen en sus estructuras ligantes aniónicos voluminosos de fuerza de campo ligante muy débil.<sup>73-77</sup>

Por lo tanto, los estados de espín de complejos de hierro(III) penta o hexa-coordinados están directamente asociados con la fuerza de campo ligante (determinado por sus características

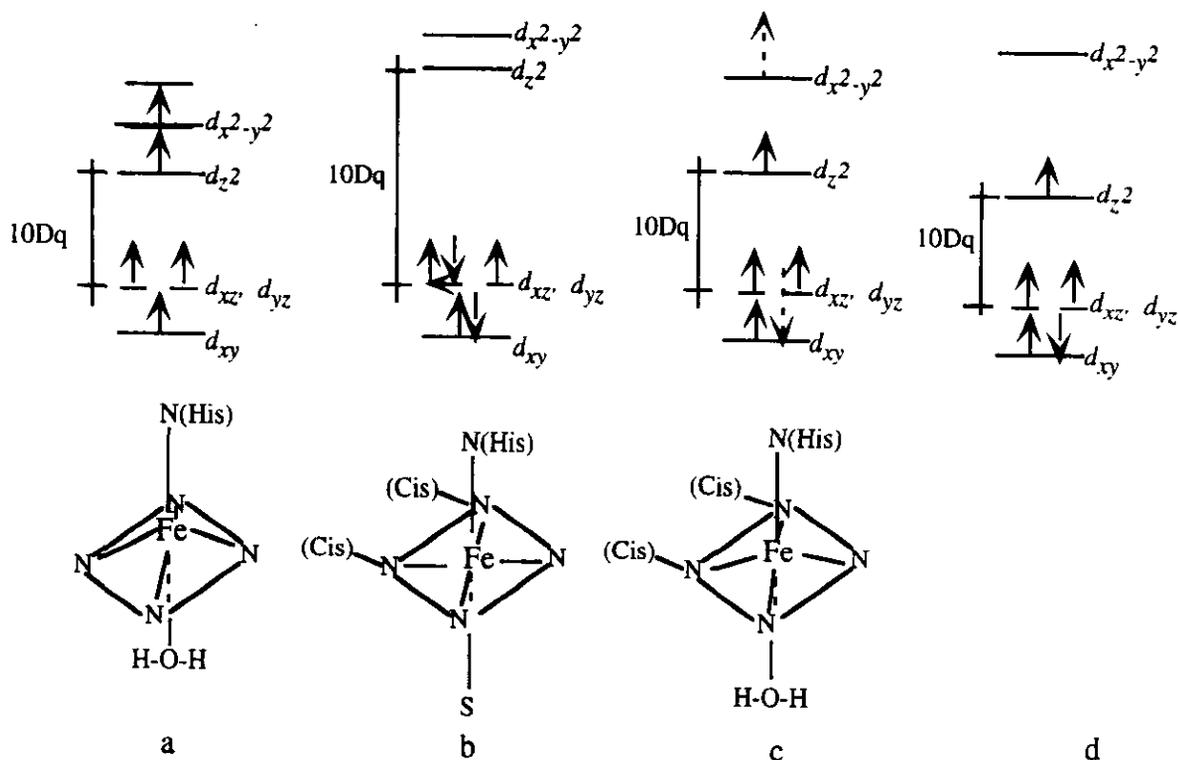


Figura 14. El orden de los electrones en los orbitales  $d$  y las configuraciones hierro-ligante para: a) un estado puro de alto espín; b) un estado puro de bajo espín y c) un estado mezclado de espín  $S = 3/2$ ,  $S = 5/2$  propuesto para *ferricitocromo c' peroxidasa*. (d) estado puro espín intermedio  $S = 3/2$ , desconocido.<sup>9</sup>

de ceder o aceptar electrones de tipo  $\pi$  o  $\sigma$ ) de los ligantes que conforman dicho complejo (Figura 15). Los halogenuros que son donadores de  $\sigma$  y  $\pi$ -electrones dan complejos de alto espín,  $S = 5/2$  (Figura 14a). Ligantes como el  $\text{CN}^-$  de campo ligante fuerte que son donadores de electrones tipo  $\sigma$  y aceptores de electrones tipo  $\pi$ , dan complejos de bajo espín,  $S = 1/2$ . Los ligantes como las aminas que son donadores de electrones- $\sigma$  (no tiene interacciones  $\pi^*$  antienlazantes o  $\pi^{\text{nb}}$  no-enlazantes con el metal), producirán un desdoblamiento de los orbitales  $d$  intermedio a los dos casos anteriores,  $S = 3/2$  mezclado cuánticamente con alto espín,  $5/2$  (Figura 14 c).<sup>80</sup>

Ese estado de espín cuánticamente mezclado  $3/2$ ,  $5/2$ , dice Reed y colaboradores,<sup>5</sup> da lugar a que las propiedades magnéticas de complejos de  $\text{Fe(III)}$  caigan en un continuo limitado

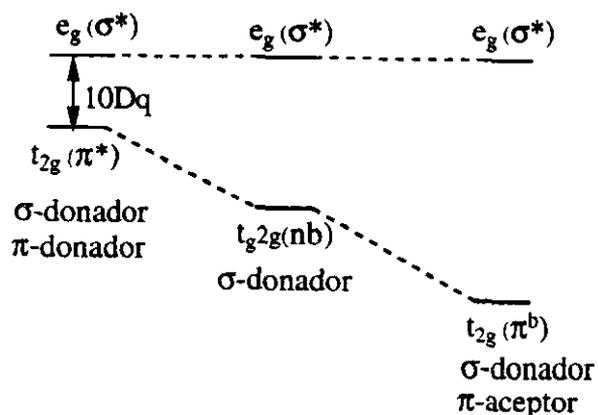


Figura 15. Efecto del ligante en la magnitud del  $10 Dq$ .<sup>80</sup>

por los estados extremos puros de espín  $5/2$  y  $1/2$ . Lo que implica que el hierro esté desplazado del plano del hemo al máximo cuando se tiene un alto estado de espín y esté en el plano en el bajo espín.

En términos generales, los cambios espectroscópicos de UV-Vis de los nuevos complejos de porfirinas-Fe(III)-picdien que se reportan en este trabajo, protoporfirina-Fe(III)-picdien (5) y mesoporfirina-Fe(III)-picdien (6) y deuteroporfirina-Fe(III)-picdien (7), respecto a sus precursores (coordinados con cloruro y metanol), indicarían una fuerte posibilidad de su hexacoordinación con ligantes de menor fuerza de campo ligante (los piridilos del picdien), si éstos se coordinaran en las posiciones quinta y sexta, dando con ello un desplazamiento del plano del hemo del catión férrico, diferente para cada uno de esos nuevos complejos.

Con respecto a la disminución en las intensidades de los espectros de UV-Vis de los complejos porfirinas-Fe(III)-picdien (5-7), con respecto a las porfirinas precursoras (1-3), y de acuerdo a las reglas de selección para la espectroscopía de UV-Vis,<sup>80</sup> algunos sitios de hierro-hemo-proteínas presentan distorsión del campo ligante alrededor del metal, lo que hace posibles algunas transiciones  $d \rightarrow d$ , que son prohibidas por Laporte.<sup>80</sup>

Las transiciones  $d \rightarrow d$  deben tener valores de  $\epsilon$  aproximados a  $100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , las que

disminuyen su intensidad en la medida en la que el sitio se vuelve menos distorsionado.<sup>82</sup>

En consecuencia, no obstante que la simetría del campo ligante para los nuevos complejos porfirinas-Fe(III)-picdien (5-7) sigue siendo el mismo que para las porfirinas de partida sin picdien (1-3),  $\leq D_{4h}$  (dos bandas Q), la disminución de la intensidad de las absorciones sugieren que la distorsión del campo ligante de las porfirinas con picdien (5-7), disminuye. De acuerdo a las amplias posibilidades que presentan este tipo de compuestos, una estructura menos distorsionada requiere de que el ion metálico esté más cerca del plano de la porfirina, lo que muestra una tendencia a un espín con menos carácter 5/2.<sup>28,29,73,74,83-85</sup>

La Tabla 4 resume el comportamiento espectroscópico de UV-Vis de algunas hemoproteínas que se va a comparar con el comportamiento espectroscópico de las porfirinas-pinza que se presentan en este trabajo.

Tabla 4. Comportamiento espectroscópico de UV-Vis de nativas.

Peroxidasa	espín S	hombro nm	Soret nm	$\beta$ nm	$\alpha$ nm	$\Delta(\alpha - \beta)$ (nm)	Ref
<i>Peroxidasa de rábano blanco</i>	5/2	-	405	503	644	141	43
<i>Citocromo P-450-alcanfor</i>	5/2		391	510- 540	646	94	84
<i>Chromatium ferricitocromo c'</i>	*5/2, 3/2	375	396-408	500	535	35	7
<i>Peroxidasa de rábano blanco</i>	1/2	-	422	541	574	33	84
<i>Citocromo P-450</i>	1/2	361	424	538	570	32	86

\*Mezcla cuántica de estados de espín 5/2, 3/2 para el hierro(III).<sup>7</sup> Temperatura ambiente, pH = 1-10.5. A pH = 7 la banda en 635 nm se minimizó.<sup>84</sup> Temperatura = 0<sup>0</sup> y 77<sup>0</sup>, pH = 9, ciano derivado de HRP<sup>86</sup> Temperatura = 4<sup>0</sup> C, pH = 7, derivado de sulfuro de dimetilo.

De las cinco hemoproteínas de la Tabla 4 solamente la *ferricitocromo c' chromatium*<sup>7</sup> se reporta como complejo de Fe(III) con un estado de espín mezclado cuánticamente S = 3/2,

$S = 5/2$ , es uno de los pocos trabajos que especifica la presencia de un hombro en longitudes de onda de 375 nm. En el *citocromo P-450*<sup>86</sup> se reporta el hombro en 361 nm y un espín bajo 1/2.

De esa Tabla 4 se observa que el comportamiento espectroscópico de UV-Vis para las hemoenzimas reportadas con Fe(III) en alto espín 5/2 y en bajo espín 1/2 es marcadamente diferente; sin embargo, no se puede establecer un comportamiento característico para el espín mezclado cuánticamente 3/2, 5/2, y que sea distinto de los dos anteriormente mencionados.

En términos generales, los nuevos complejos reportados en este trabajo porfirina-Fe(III)-picdien (5-7) son modelos espectroscópicos de UV-Vis de las hemoproteínas reportadas en la Tabla 4 como de alto espín 5/2, o de espín mezclado cuánticamente 5/2, 3/2.

El comportamiento en la espectroscopía de UV-Vis de otros complejos de porfirinas-pinza-Fe(III) reportados en otros trabajos, se presenta en la Tabla 5. Estos complejos fueron preparados a partir de protoporfirina, 3,6,9,12-tetrafenilporfirina y octaetilporfina, todas ellas con Fe(III).

Tabla 5. Transiciones electrónicas para complejos de hierro(III)-porfirinas

Complejo	Espín	Soret (nm)	$Q_1$ (nm)	$Q_2$ (nm)	$Q_3$ (nm)	Ref
Protoporfirina-Fe(III)-Cl	5/2	396	530	570	615	29
Tetrafenilporfirinato-Fe(III)-(B <sub>11</sub> CH <sub>12</sub> )	5/2,3/2 mezcla	406	500		675	87
[Octaetilporfirinato-Fe(III)-(2-MeIm)] ClO <sub>4</sub>	5/2, 3/2 mezcla	381	500		637	88
Tetrafenilporfirinato-Fe(III)-(OReO <sub>3</sub> )-tolueno	5/2, 3/2 mezcla	415	509		688	89
Octaetilporfirinato-Fe(III)-ClO <sub>4</sub>	3/2	380	500		633	75
Protoporfirina-Fe(III)-(1-MeIm) <sub>2</sub>	1/2	424	529	558	638	90

<sup>29</sup>Disolvente dimetilformamida.

Es notorio que para todos los complejos reportados en la Tabla 5, aparece una banda a  $\lambda > 600$  nm no importando el estado de espín que se reporte. Los modelos de porfirinas-Fe(III)-picdien que se reportan en este trabajo (5-7) no presentan bandas a  $\lambda > 600$  nm.

Para los complejos de alto espín,  $S = 5/2$  (Tabla 5), se observa un corrimiento de la banda de Soret hacia el UV cercano para el complejo protoporfirina-Fe(III)-Cl. Esta misma banda de Soret está más en el visible cuando el derivado de la protoporfirina-Fe(III)(1-MeIm)<sub>2</sub> es de bajo espín,  $1/2$ . De acuerdo a lo reportado en la Tabla 5, la posición de esta misma banda se encuentra en longitudes de onda intermedias para los complejos con mezcla cuántica de espín  $3/2$ ,  $5/2$ .

Para los complejos de porfirinas-pinza 6-7 (Tabla 3, pág. 28), la posición del Soret está comprendida en los datos reportados para alto espín y espín intermedio. Respecto a las bandas  $Q$  de los complejos porfirinas-Fe(III)-picdien (5-7) que se reportan en este trabajo, son dos, igual que para los complejos de espín mezclado cuánticamente, reportados en la Tabla 5. Sin embargo, las longitudes de onda en las que se encuentran son diferentes al resto de los complejos reportados en otros trabajos.

Para concluir diremos que el comportamiento en el UV-Vis del complejo de porfirina-Fe(III)-picdien 5 es más cercano al de algunas peroxidasas nativas y a los modelos con mezcla cuántica de espines  $3/2$ ,  $5/2$  que los otros dos complejos 6 y 7 que modelan mejor a las porfirinas-Fe(III) de alto espín. Y de acuerdo a lo reportado por Boersma y Goff,<sup>79</sup> el ligante picdien se enlaza más fuertemente al hierro(III) en el orden protoporfirina-Fe(III)-picdien < mesoporfirina-Fe(III)-picdien ~ deuteroporfirina-Fe(III)-picdien, de acuerdo a la posición de la banda  $Q_2$ . Sin embargo, en cada complejo porfirina-pinza el ligante picdien se enlaza más débilmente que el cloruro en las hierroporfirinas de alto espín de partida.

### II.3.2 Dicroísmo Circular Magnético (DCM).

En la Figura 16 c se presenta el espectro de DCM del complejo deuteroporfirina-Fe(III)-picdien 7. El espectro se obtuvo en el UV-Vis (300-650 nm) y es típico de porfirina-hierro(III), el cual presenta la banda de Soret en un intervalo de  $\lambda = 382.69-401.92$  nm con una elipticidad molar  $[\Theta]_M = +2\ 912.6-(-53\ 009.7)$  grad cm<sup>2</sup> d mol<sup>-1</sup> Gauss<sup>-1</sup>, característica de hierro(III) de alto espín.<sup>88-90</sup> En la zona del visible se observan tres bandas *Q* en un intervalo de 465-585 nm con elipticidades molares diez veces menores que la del Soret. La distribución, elipticidad molar y forma de las bandas *Q* es también característica de porfirinas-Fe(III) de alto espín.<sup>90-92</sup> Es evidente el cambio que tiene el espectro de DCM de la deuteroporfirina-Fe(III) precursora (Figura 16 a) cuando el ligante axial picdien se coordina, la elipticidad molar disminuye, las bandas se afinan notablemente, el Soret cambia su sentido en el inicio del espectro (300 nm), y permanece el número de bandas *Q*. Los espectros de DCM de las otras porfirinas-Fe(III)-picdien (5 y 6) son muy semejantes al de la Figura 16 (b) y se encuentran en el apéndice 2.

El comportamiento de los complejos de porfirinas-hierro(III)-picdien que se estudiaron en este trabajo es muy semejante al reportado para moléculas de interés biológico,<sup>93</sup> cuando en la presencia de un campo magnético absorben las componentes de la luz circularmente polarizada, dando transiciones que son desplazadas en direcciones espectrales opuestas. Por otro lado, estos espectros son muy semejantes a la primera derivada de los espectros de absorción correspondientes, comportamiento que nos será útil como se verá más adelante (Figuras 16b y 16d y apéndice 2).

En la Tabla 6 se presentan los datos que caracterizan a los espectros de DCM de los complejos de porfirina-Fe(III)-picdien 5-7 que se estudiaron en esta investigación, así como los correspondientes a las porfirinas precursoras libres de picdien 1-3.

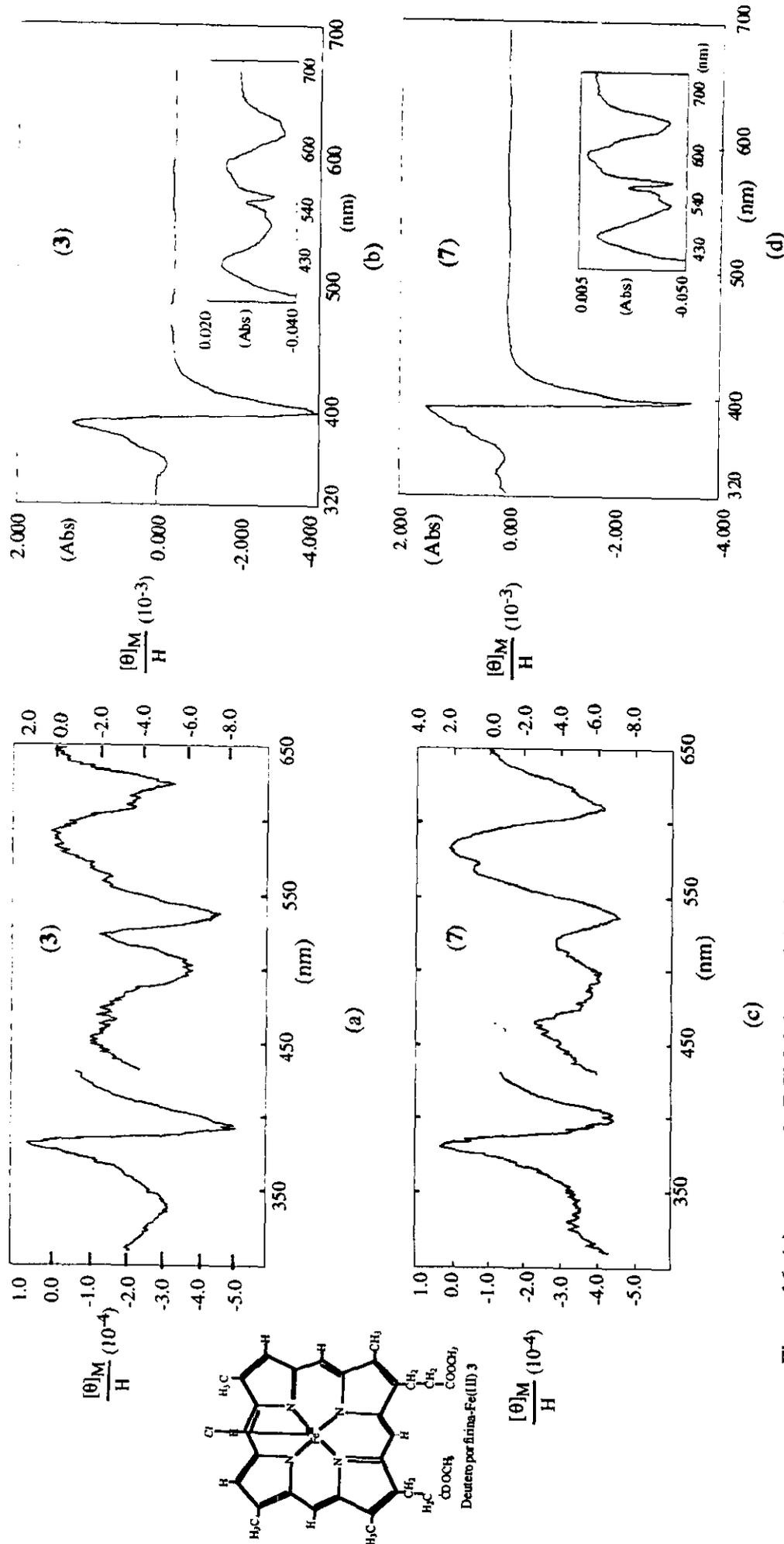
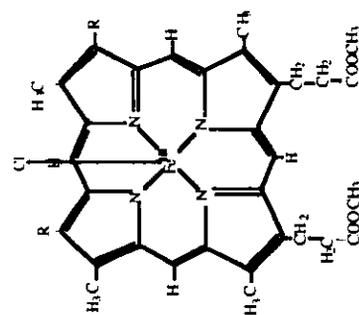


Figura 16. (a) espectro de DCM del complejo deuterioporfirina-Fe(III) 2; (b) primera derivada del espectro de UV-Vis del complejo deuterioporfirina-Fe(III) 2; (c) espectro de DCM del complejo deuterioporfirina-Fe(III)-picdien 7; (d) primera derivada del espectro de UV-Vis del complejo deuterioporfirina-Fe(III)-picdien 7. La elipticidad molar  $[\theta]_M$  tiene unidades de  $[\text{grados cm}^2 \text{dmol}^{-1}]$ .

Tabla 6. Datos de la espectroscopía de DCM para los complejos porfirina-Fe(III)-picdien 5-7 estudiados en esta investigación y sus complejos precursores.

Complejo	Soret		Q(I)		Q(II)		Q(III)			
	$\lambda_S$	$[\theta]_{M_S} (10^3)$	$\lambda_1$	$[\theta]_{M_1} (10^3)$	$\lambda_2$	$[\theta]_{M_2} (10^3)$	$\lambda_3$	$[\theta]_{M_3} (10^3)$		
protoporfirina-Fe(III) <b>1</b>	385.86 403.77	-3.5 -8.1	477.93 501.89	+0.09 -0.64	0.73	528.31 545.29	-0.09 -1.0	607.55 637.74	+0.09 -0.53	6.24
protoporfirina-Fe(III)- picdien <b>5</b>	394.35 411.32	-1.2 -4.5	479.76 498.68	-0.03 -0.62	0.59	524.53 547.55	-0.23 -0.81	593.40 622.64	+0.44 -0.79	1.23
mesoporfirina-Fe(III) <b>2</b>	376.92 396.15	-2.7 -20.2	465.38 500.95	-1.0 -4.44	3.40	524.99 540.38	-2.3 -5.7	601.91 632.68	-0.40 -3.64	3.23
mesoporfirina-Fe(III)- picdien <b>6</b>	389.61 407.69	-3.1 -14.6	464.42 496.15	-2.74 -5.58	2.83	519.22 540.38	-3.4 -5.3	592.30 619.22	+0.97 -4.85	5.82
deuteroporfirina-Fe(III) <b>3</b>	382.69 398.38	+5.8 -51.2	451.92 498.07	-1.40 -7.5	6.08	523.07 536.53	-1.3 -7.7	591.33 623.06	+0.23 -5.50	5.73
deuteroporfirina-Fe(III)- picdien <b>7</b>	382.69 401.92	+2.9 -53.0	465.38 496.17	-2.34 -6.55	4.21	519.22 536.53	-3.6 -7.1	584.60 609.60	+2.34 -6.55	8.89



El DCM es una propiedad de la materia que se manifiesta cuando se absorbe la luz circularmente polarizada a la derecha e izquierda de manera desigual. Las transiciones entre estados electrónicos pueden ser inducidos por un fotón polarizado circularmente que tiene, además de energía, paridad y componente z del momento angular  $L_j$ , definida para la luz circularmente polarizada a la izquierda  $L_j = +1$  y a la derecha es  $L_j = -1$ . Esto conduce inmediatamente a las reglas de selección para la absorción de la luz circularmente polarizada a la derecha e izquierda con  $\Delta L_j = +1$  y  $\Delta L_j = -1$ , respectivamente. El DCM es una forma espectroscópica de alto orden que puede aumentar la información obtenida cuando se mide la absorción de la radiación electromagnética no-polarizada.<sup>94-96</sup>

Las unidades de DCM están en función de la diferencia de la absorción de luz polarizada a la derecha (d) y a la izquierda (i),  $\Delta A$ ; de la diferencia del coeficiente de extinción molar,  $\Delta \epsilon$  y de los grados de elipticidad,  $\Theta$ . La relación entre la diferencia de absorción de la luz circularmente polarizada a la derecha e izquierda y el ángulo de elipticidad es  $\Delta A \times 33 = \Theta$  ;

$$\text{DCM} \left\{ \begin{array}{l} \Delta \epsilon_M = \Delta \epsilon / H = \frac{\Delta A}{b c H} = \frac{\theta_{obs}}{33 b c H} \text{ en } [M^1 \text{cm}^{-1} T^{-1}] \\ [\theta]_M = \frac{100 \theta_{obs}}{b c H} \text{ en } [\text{grad cm}^2 \text{ dmol}^{-1} T^{-1}] \end{array} \right.$$

c es la concentración molar; b es la distancia que recorre el rayo de luz en la muestra y H es la fuerza del campo magnético aplicado, en unidades Tesla.  $\Delta \epsilon$  y  $\Delta A$  son valores inducidos por el campo magnético.<sup>94</sup>

En el DCM se pueden diferenciar tres tipos de efectos (términos A, B y C) basándose en la naturaleza de las transiciones que se involucran. Típicamente el espectro tipo B es menos intenso y el más intenso es el C.<sup>80,83,94-96</sup>

Espectro de DCM tipo A. Se obtiene cuando el primer estado excitado que está involucrados en la transición es no degenerado, ésto es, cuando hay dos o más estados que tienen exactamente la misma energía en la ausencia de un campo magnético aplicado.<sup>93</sup>

Un campo magnético aplicado puede romper la degeneración (efecto Zeeman) del estado final a energías un poco más baja y más alta (Figura 17).

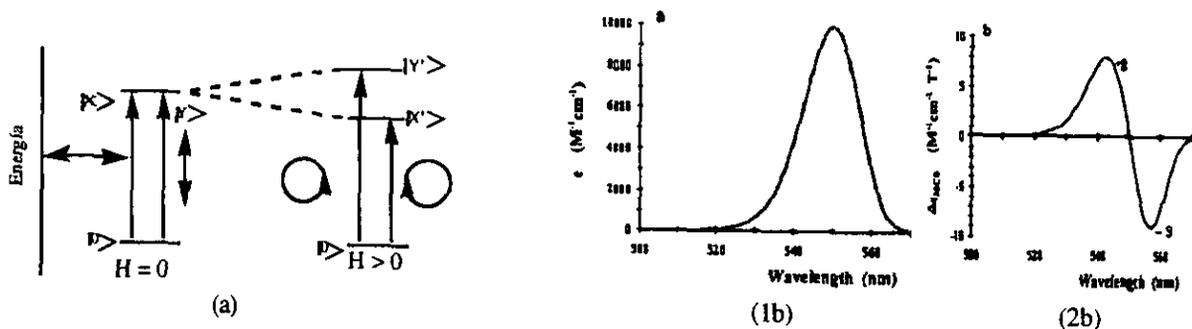


Figura 17. (a) Diagrama de niveles de energía ilustrando el DCM tipo A. (1b) Espectro de absorción. (2b) Espectro de DCM.<sup>95</sup>

El espectro de DCM tipo B. Se observa cuando los estados inicial y final responsables de las transiciones son únicos en energía. Si en la ausencia de un campo magnético externo las energías del estado inicial y final correspondientes a la absorción de un fotón son diferentes de algunos otros estados en la molécula, se dice que los estados son no degenerados, como la transición inducida por un fotón entre ellos. El campo magnético modifica o perturba estos estados muy débilmente.<sup>96</sup>

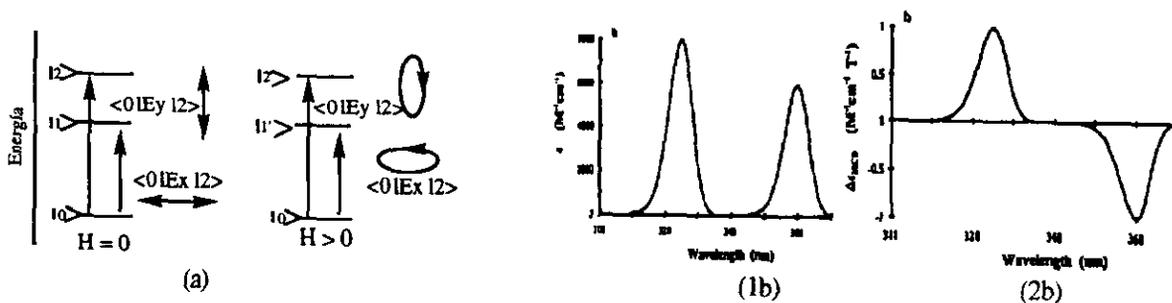


Figura 18. (a) Diagramas de los niveles de energía ilustrando un DCM tipo B. (1b) Espectro de absorción. (2b) Espectro de DCM.<sup>95</sup>

Las perturbaciones introducidas por un campo magnético afectan los pares de estados acoplados por el campo magnético de una forma idéntica en magnitud pero de signo opuesto. El DCM de la banda de absorción correspondiente tendría la misma magnitud pero el signo opuesto. (Figura 18).<sup>95</sup> Así, el espectro de DCM tipo B puede ser similar en forma al espectro de absorción para la misma transición, pero puede ocurrir en pares de señales con signos opuestos.<sup>95</sup>

Espectro de DCM tipo C. Si el estado inicial involucrado en una transición es no degenerado, un mecanismo diferente puede contribuir a la diferencia de absorción de la luz circularmente polarizada a la derecha e izquierda. Para una medición de absorción normal el estado inicial será el estado base del sistema. Los niveles múltiples de energía de los estados no degenerados separados por el campo magnético serán poblados de acuerdo con la probabilidad de distribución de Boltzman. Como los estados de más baja energía son más fácilmente poblados responderán a una mayor absorción del sistema, y si los estados más poblados absorben una de las componentes de la luz circularmente polarizada con preferencia, se observará una señal en el espectro de DCM. Un diagrama de niveles de energía se muestra en la Figura 19.

Una aplicación cuantitativa del espectro de DCM que sea parecido a la primera derivada del espectro de absorción, puede ser utilizada para determinar la magnitud del desdoblamiento inducido de campo cero. La magnitud del desdoblamiento por unidad de campo magnético está relacionado con la magnitud del momento angular  $|L|$  del estado degenerado y por lo tanto puede ser usado para determinar este parámetro.<sup>95</sup>

Las investigaciones de DCM reportadas para complejos de hierro-porfirinas dan suficiente evidencia para poder diferenciar un espectro de porfirina-hierro(II) del de porfirina-hierro(III) con alto o bajo espín, por las posición y forma de las bandas de Soret y de la banda

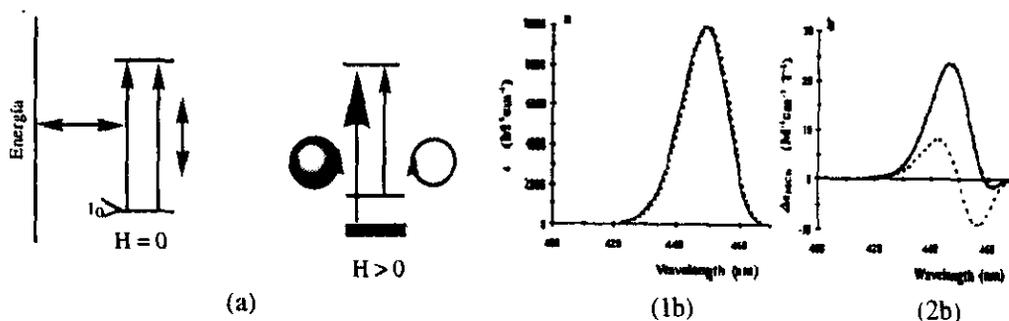


Figura 19. DCM tipo C. (a) Niveles de energía para un sistema en el cual el estado base es doblemente degenerado. (1b) Espectro de absorción. (2b) Espectro de DCM correspondiente al diagrama de niveles de energía de al lado. Para temperaturas a las cuales  $kT \gg$  que la diferencia en energía de los estados degenerados resueltos por el campo magnético. El espectro de DCM será dominado por un espectro tipo A y simula la derivada del espectro de absorción, como es el caso de la curva punteada. Para temperaturas a las cuales  $kT$  es comparable a la diferencia en energías de los estados resueltos (curva continua), la probabilidad de mayor ocupación del estado de más baja energía dará como resultado una absorción preferencial de una polarización circular sobre la otra.<sup>95</sup>

$Q$  que se encuentra en la región visible alrededor de 520-550 nm. Los estudios experimentales han demostrado que la banda  $Q_{520}$  es muy sensible a los cambios de estado de oxidación y de espín del hierro. Otra característica de los espectros de DCM de este tipo de complejos es la relación que hay entre las amplitudes de la banda de Soret con respecto a la amplitud de la banda  $Q_{520}$  ( $A_S/A_{Q_{520}}$ ) cuyo valor da información del tipo de complejo de hemo-hierro que se tiene.<sup>84,90,96,97</sup>

Los espectros de DCM de porfirina-Fe(III) alto espín,  $S = 5/2$ , presentan la banda de Soret positiva o negativa y un poco más desplazada hacia el cercano UV que para el bajo espín,  $S = 1/2$ , para el cual se observan una o dos bandas  $Q$  juntas y más grandes; en cambio, para el alto espín pueden ser hasta tres las bandas  $Q$  que están más separadas y muy tenues. Los valores de la relación de las amplitudes son: para el alto espín  $A_S/A_{Q_{520}} > 2$  y para el bajo espín  $A_S/A_{Q_{520}} > 10$ .<sup>89,91</sup>

La Tabla 7 resume los valores de  $A_S/A_{Q_{520}}$  para las porfirinas-Fe(III)-picdien 5-7 que se estudiaron en esta investigación. Los valores de la relación de las amplitudes para los

complejos con picdien 5 y 6 están dentro de los límites para el hierro(III) alto espín, sin embargo, comparándolos con los datos de sus respectivos precursores, 1 y 2, tienden a un menor carácter 5/2. La Tabla 6 tiene registrada una banda,  $Q_3$ , para los espectros de DCM de las porfirinas-Fe(III)-picdien 5-7 en las vecindades de los 600 nm. De acuerdo con Ookubo *et al*<sup>91</sup> la presencia de una banda en  $\lambda \sim 600$  nm es también característica del alto espín 5/2.

Tabla 7. Valores de la relación  $A_S/A_{Q_{520}}$  para los compuestos porfirina-Fe(III)-picdien 5-7 y para sus precursores 1-3. Las amplitudes correspondientes se encuentran en la Tabla 6.

Complejo		$A_S/A_{Q_{520}}$	Espín
protoporfirina-Fe(III)	(1)	4.8	5/2
protoporfirina-Fe(III)-picdien	(5)	5.7	5/2
mesoporfirina-Fe(III)	(2)	5.1	5/2
mesoporfirina-Fe(III)-picdien	(6)	6.0	5/2
deuteroporfirina-Fe(III)	(3)	8.9	5/2
deuteroporfirina-Fe(III)-picdien	(7)	16.0	1/2

La posición y la forma de la banda de Soret para el complejo deuteroporfirina-Fe(III)-picdien 7 característica de Fe(III) de alto espín y el valor de la relación de amplitudes,  $A_S/A_{Q_{520}} = 16$  típica de Fe(III) típica de bajo espín permiten suponer la presencia de por lo menos dos poblaciones de Fe(III), una de alto espín y otra de bajo espín. Este tipo de comportamiento se encuentra registrado en el trabajo de Ookubo *et al*.<sup>91</sup>

En la Tabla 8 se presentan los datos de los espectros de DCM de hemoproteínas nativas que han estudiado otros grupos, con el objeto de compararlos con los datos de los complejos porfirinas-Fe(III)-picdien nuevos 5-7 que se reportan en este trabajo.

Para la proteína-Fe(III) alto espín, la banda de Soret (380 a 410 nm con elipticidades

molares negativas), las bandas  $Q$  (tres repartidas en un rango de 450 a 640 nm) y la relación de amplitudes del Soret  $Q_S$  y de la banda  $Q_{520}$ , son similares al Soret y bandas  $Q$  los de los complejos porfirinas-Fe(III)-picdien 5 y 6, de este trabajo. Para el complejo 7 deuteroporfirina-Fe(III)-picdien el valor de  $A_S/A_{Q_{520}} > 10$  dato es más cercano al Fe(III) bajo espín.

Tabla 8. Datos de los espectros de DCM de hierrohemoproteínas con estados de oxidación (II) y (III) y espines altos y bajos.

Complejo	$\lambda_{\text{Soret}}$	$[\Theta]_{M_S}$	$A_S$	$\lambda_Q$	$[\Theta]_{M_Q}$	$A_Q$	$A_S/A_Q$	Espín
<sup>82</sup> Citocromo P-450	380	+4.0	21	480	+6	11	1.9	Fe(III)
	400	-17		562	-5			5/2
<sup>95</sup> Citocromo c peroxidasa	400	+80	160	555	+4	14	11.4	Fe(III)
	425	-80		560	-10			1/2
<sup>95</sup> Deoxi-mioglobina	430	-7.0	27	560	+65	0.74	36	Fe(II)
	450	+20		620	-09			2
<sup>95</sup> Citocromo c peroxidasa	420	+0.7,	0.9	550	+4	8	0.11	Fe(II)
	430	-0.2		552	-4			2
<sup>95</sup> Citocromo c peroxidasa	420	+80,	115	550	+270	540	0.21	Fe(II)
	430	-35		555	-270			0

En la Tabla 9 se presentan los datos de los espectros de DCM de diferentes complejos de protoporfirina-hierro(III) reportados en otras investigaciones. Se puede observar Fe(III)-picdien que para los complejos de hierro(III) alto espín las posiciones de las bandas de Soret están ubicadas en un rango de 404 a 422 nm con una elipticidad molar más positiva  $Q$  que negativa y con una amplitud mayor en relación con las bandas  $Q$ .<sup>91</sup>

En este trabajo<sup>91</sup> (Tabla 9) se demuestra que la polaridad del disolvente influye en el comportamiento de los complejos  $Q$  que se van formando de acuerdo a la cantidad de 1-metilimidazol que se va adicionando. Cuando se agrega un exceso de 1-metilimidazol se obtiene un espectro de DCM con características de complejo de hierro(III) con bajo espín, con un valor de  $A_S/A_Q = 8.7$ . Si se adiciona aún más 1-metilimidazol, los espectros de DCM que simulan a los experimentales se obtienen de mezclas de Fe(II) y Fe(III) con altos y bajos espines.

Tabla 9. Resumen de datos espectroscópicos de DCM de complejos de protoporfirina-hierro(III) y hierro (II).

Complejo	1-Me- Im	$\lambda_{\text{Soret}}$	$[\Theta]_{\text{MS}}$	$A_{\text{S}}$	$\lambda_{\text{Q}}$	$[\Theta]_{\text{MQ}}$	$A_{\text{Q}}$	$A_{\text{S}}/A_{\text{Q}}$	S
protoporfirina- p-NF-	20	403-	+6.4	7.1	524	+1.3	3.6	2.7	Fe(III)
		415	-3.2		528	-2.3			5/2
protoporfirina- p-NF-	20	404-	+5.2	7.3	594	+1.3	3.8	3.8	Fe(III)
		423	-2.1		629	-2.5			5/2
protoporfirina- p-NF-	2 000	402	20.2	44.2	552	2.4	5.1	8.7	Fe(III)
		418	-24.0		576	-2.7			1/2
protoporfirina- p-NF-	10, 000	405	+7.1	15.2	553	17.3	36.6	0.42	* 0
		421	-8.1		561	-19.3			1/2
FePP-pNF	10,000	405-	+9.7	21.1	554	16.4	33.6	0.63	Fe(II)
		421	-11.4		561	-17.2			0

pNF = para-nitrofenolato. Disolventes: a = clorometano; b = tolueno; c = clorobenceno. 1-MeIm = 1-metilimidazol agregado en diferentes concentraciones que se consignan en la tabla. \*mezcla de 3 por ciento de Fe(II) con S = 0, 64 por ciento de Fe(III) con S = 1/2.

La comparación de los datos de DCM de los complejos que se reportan en este trabajo con los contenidos en la Tabla 9 confirma que los complejos porfirina-Fe(III)-picdien tienen hierro(III) con un estado de alto espín de los complejos 5 y 6, y con dos especies para el 7: de alto y bajo espín.

La semejanza que tienen los espectros de DCM de las porfirinas-Fe(III)-picdien (5-7), que se reportan en esta investigación con las primeras derivadas de sus respectivos espectros de UV-Vis, indica que esos espectros de DCM son tipo A o pseudo tipo A,<sup>94-96,98</sup> lo cual permite relacionar de una manera semicuantitativa las longitudes de onda de la banda de Soret de los espectros de DCM con el estado de espín del hierro.<sup>98</sup> De esta manera se calcularon los momentos magnéticos aproximados de cada complejo de porfirinas-Fe(III), 1-3, y el de sus correspondientes complejos con picdien, 5-7.

Partiendo del hecho de que el momento magnético electrónico  $\mu$  es un vector de igual magnitud dirección pero de sentido opuesto al del momento angular del electrón L, se procedió a calcular la magnitud del momento angular. Para ello se relaciona la energía del momento

angular con la intensidad del campo magnético,  $(h\nu)_L/|H|$  aplicado y se obtiene la magnitud del momento angular  $|L|$ .

A partir de los datos de  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  del Soret en los espectros de DCM de las porfirinas-Fe(III)-picdien y de sus precursoras, se calcularon las energías  $E_1$  y  $E_2$  utilizando la ecuación la ecuación (1):

$$E = h \nu = hc/\lambda \quad (1)$$

siendo  $h$  la constante de Planck ( $6.626 \times 10^{-27}$  erg s) y  $c$  la velocidad de la luz ( $2.998 \times 10^{10}$  cm  $s^{-1}$ ). Los resultados de las energías se calcularon en ergios. El factor de conversión de la magnitud de  $|L|$  a magnetones de Bohr ( $\beta e$ ) es  $9.27 \times 10^{-21}$  ergios  $G^{-1}/\beta e$ . Sabiendo que el momento magnético de un electrón es el valor de la  $g$  (2.0023) para el electrón libre por los magnetones de Bohr ( $g\beta e$ ), se hace la transformación multiplicando los magnetones de Bohr por el factor  $1.00115 \beta e$ . También se hace la corrección de la concentración de mM a M.

En la Tabla 10 se resumen los resultados de los cálculos y de la interpretación de ellos obtenida de los espectros de DCM de los complejos porfirinas-pinza y sus precursores.

Esta última fase de la información obtenida de la espectroscopía de DCM apoya el comportamiento de las porfirinas libres del ligante picdien, con las que iniciamos este trabajo, las cuales tienen hierro en estado de oxidación III y un estado de alto espín 5/2. Sistemáticamente la magnitud del momento magnético calculado,  $\mu_e$ , baja para dos de los nuevos complejos el 6 y el 7.

Esto implica la posibilidad de un cambio en el carácter del estado de espín 5/2 para esos dos complejos 5 y 6. En cambio para el complejo deuteroporfirina-Fe(III)-picdien, 7, el

Tabla 10. Información obtenida del tratamiento de los datos de espectroscopías óptica y DCM para la banda de Soret de los complejos de hierro(III)porfirinas reportados en esta investigación.

Complejo	DCM (nm) $\lambda_{\text{máx.}}-\lambda_{\text{min}}$	$\Delta E \cdot 10^{13}$ erg	$ L  \cdot 10^{-17}$ erg G <sup>-1</sup>	$ \mu_e $ MB	No. de e <sup>-</sup> despareados. Aprox.
Protoporfirina-Fe(III) 1	385.9-403.8	2.28	5.70	6.15	5
Protoporfirina-Fe(III)-picdien 5	394.4-411.3	2.14	5.34	5.77	5
Mesoporfirina-Fe(III) 2	384.4-404.3	2.54	6.36	6.87	5
Mesoporfirina-Fe(III)-picdien 6	386.5-407.7	2.50	6.63	6.7	5
Deuteroporfirina-Fe(III) 3	382.7-398.4	2.05	5.11	5.52	5
Deuteroporfirina-Fe(III)-picdien 7	382.7-401.9	2.46	6.14	6.63	5

momento magnético aumenta con respecto a su precursor sin picdien, dato que siguiendo la misma lógica que para los dos anteriores, indicaría una población mayor con un fuerte carácter de alto espín y una menor población de bajo espín, para este complejo.

información del estudio de DCM para este último complejo indica la presencia de un complejo Fe(III) con dos poblaciones, una de alto espín y otra de bajo espín.

### II.3.3 Resonancia magnética nuclear de protón.

En la Figura 20 se muestran los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de los complejos protoporfirina-Fe(III)-picdien **5**, mesoporfirina-Fe(III)-picdien **6**, deuteroporfirina-Fe(III)-picdien **7** y de las porfirinas-Fe(III) iniciales (**1-3**). Las asignaciones de los desplazamientos isotrópicos para los seis complejos se hicieron con base en los trabajos de Budd *et al.*,<sup>99</sup> Dugad *et al.*,<sup>100</sup> Kurland *et al.*,<sup>101</sup> Satterlee *et al.*<sup>102</sup> y La Mar *et al.*<sup>30</sup>

Las señales de RMN de protón de los cuatro metilo-hemo son fácilmente localizables por su mayor intensidad y por su posición a frecuencias más altas ( $>74$  ppm) en porfirinas-Fe(III) de alto espín  $S = 5/2$ ,<sup>79,99-101</sup> a frecuencias menores ( $< 74$  ppm) para Fe(III) con espín mezclado cuánticamente  $S = 3/2$ ,  $S = 5/2$ ,<sup>1,6,79,80</sup> y a frecuencias de compuestos diamagnéticos para Fe(III) bajo espín  $S = 1/2$ .<sup>30,102,103</sup> La Tabla 11 contiene los datos de los espectros de RMN de protón para los complejos porfirinas-pinza y para las porfirinas libres del ligante picdien, tomados a temperatura ambiente en metanol deuterado.

Las resonancias de los metilo-hemo para las porfirinas iniciales libres de picdien **1-3** están en el intervalo de 63-75 ppm del alto espín,  $S = 5/2$ ,<sup>1,79</sup> y del espín mezclado cuánticamente  $S = 5/2$ ,  $3/2$ ,<sup>1,75-81</sup> para el hierro(III). Para los complejos porfirinas-pinza **5-7** las señales de los metilos-hemo se encuentran en 40-42 ppm que indiscutiblemente corresponde a una mezcla cuántica de espín  $S = 5/2$ ,  $3/2$  y con una hexacoordinación.<sup>75-81,100,101</sup> El espectro de RMN de protón para el complejo deuteroporfirina-Fe(III)-picdien **7**, presenta los desplazamientos de los metilo-hemo en 40 ppm, igual que los otros dos complejos porfirina-pinza con espín mezclado  $3/2$ ,  $5/2$ , pero tiene una señal en 76 ppm característica de los protones 2,4 del hemo y que corresponde a alto espín.<sup>101</sup>

Una de las señales en los espectros de RMN de protón de las porfirinas-Fe(III) **1-3** utilizadas como materia prima en este trabajo que cambia de frecuencia y que es muy notoria, es

la correspondiente a los protones meso que aparecen menos definidas e intensas y en frecuencias más bajas (~ 39-48 ppm) que los metilos-hemo para porfirinas-Fe(III) de alto espín.<sup>79,99-103</sup>

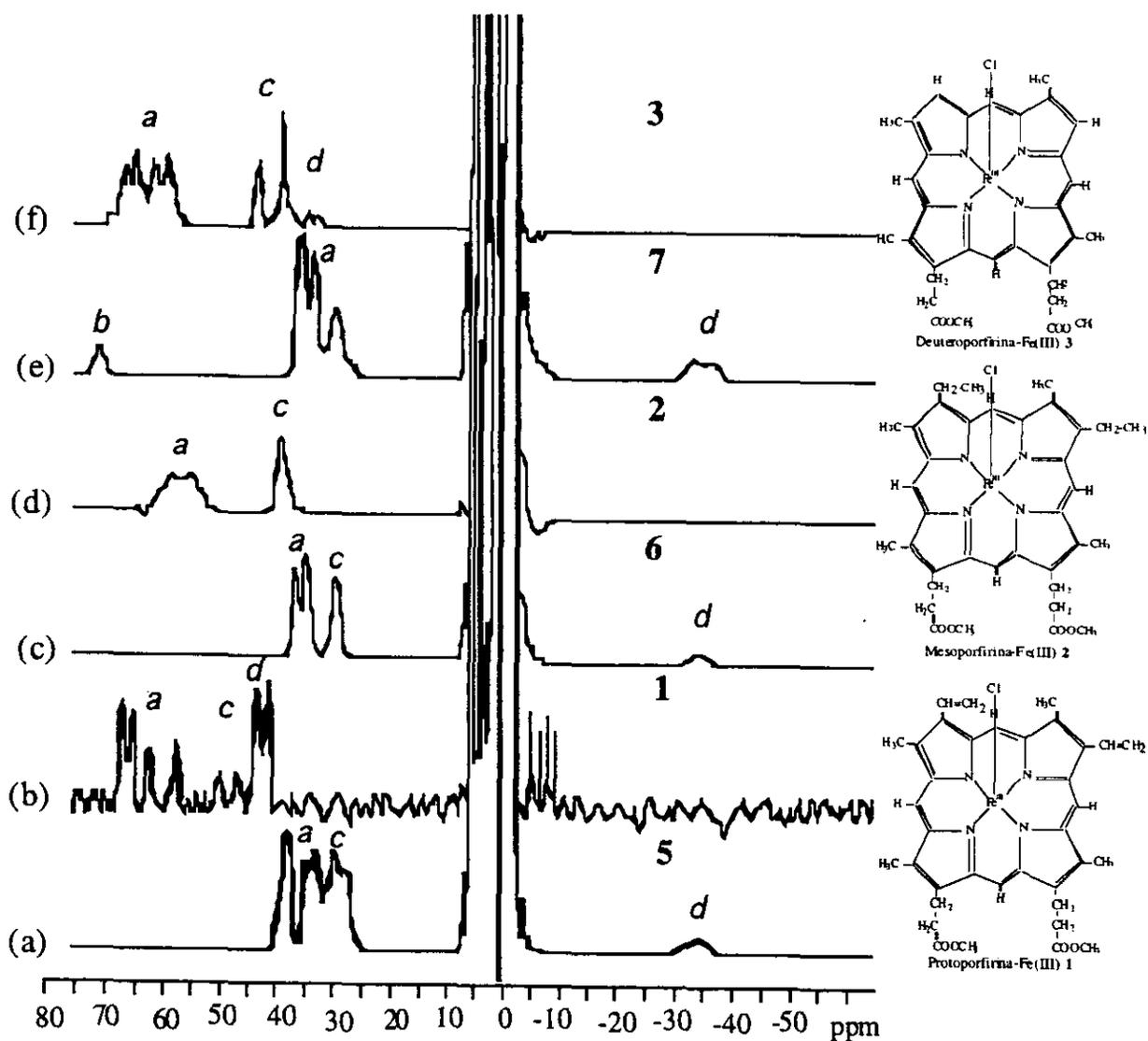


Figura 20. Espectros de RMN de <sup>1</sup>H de 500 MHz de (a) protoporfirina-Fe(III)-picdien **5**, (b) protoporfirina-Fe(III) **1**, (c) mesoporfirina-Fe(III)-picdien **6**, (d) mesoporfirina-Fe(III) **2**, (e) deuteroporfirina-Fe(III)-picdien **7** y (f) deuteroporfirina-Fe(III) **3**. En todos los casos, los sustituyentes del hemo están marcados como: a, hemo-CH<sub>3</sub>; b, 2,4-H; c, α-CH<sub>2</sub>; d, meso-H<sup>16-28,52,53</sup> El disolvente fue CD<sub>3</sub>OD, la temperatura 25 °C. Referencia, TMS.

Tabla 11. RMN de  $^1\text{H}$  de los complejos porfirina-Fe(III) y de sus derivados de picdien.

Complejo	CH <sub>3</sub> -hemo (ppm) <i>a</i>	Apertura CH <sub>3</sub> -hemo	Promedio CH <sub>3</sub> -hemo (ppm)	Qasim. (ppm)	2,4-H (ppm) <i>b</i>	meso-H (ppm) <i>d</i>	$\alpha$ -CH <sub>2</sub> (ppm) <i>c</i>
protoporfirina- Fe(III) (1)	71.39, 70.46 66.93, 62.03	9.00	67.70	0.13		47-47.6	51.61
protoporfirina- Fe(III)-picdien (5)	42.21, 42.21 38.71, 37.93	4.28	40.26	0.10			-32.05
mesoporfirina- Fe(III) (2)	62.98, 62.98 61.17, 60.39	2.60	61.89	0.04			43.47
mesoporfirina- Fe(III)-picdieno (6)	40.34, 40.34 39.13, 39.13	1.21	39.73	0.03		-33.35	33.59
deuteroporfirina -Fe(III) (3)	74.60, 71.02 66.57, 61.97	12.63	70.04	0.18		37-38.79	45-48.5
deuteroporfirina- Fe(III)-picdien (7)	39.62, 39.62 38.25, 33.59	6.03	37.77	0.16	76.40	-32.44	33.59

Se utilizaron disoluciones de las porfirinas en CD<sub>3</sub>OD. La referencia fue TMS.

Cuando se enlaza el ligante picdien axialmente a la hierroporfirina, las señales de esos hidrógenos meso se desplazan a frecuencias muy bajas (~ -33 ppm) conforme las señales de los metilos-hemo aparecen en frecuencias más bajas que para el alto espín.<sup>79</sup>

Los desplazamientos hiperfinos de las resonancias de protón que provienen de las interacciones con los electrones desapareados en moléculas paramagnéticas, son tan grandes como algunos cientos de ppm a campos bajos o altos. Las interacciones electrón-protón también ensanchan las señales y los espectros solamente darán información sobre moléculas paramagnéticas si la interacción hiperfina es grande comparada con la anchura de línea. Generalmente este es el caso cuando el tiempo de relajación de espín electrónico es muy corto.<sup>100</sup>

El desplazamiento isotrópico para un protón en un complejo puede ser obtenida de las

diferencias en los desplazamientos del protón en un compuesto paramagnético y en un complejo metálico diamagnético análogo, o un ligante;<sup>101</sup>

$$(\Delta H/H)_{iso} = (\Delta H/H)_{paramagnético (DIP)} - (\Delta H/H)_{diamagnético} \quad (2)$$

El desplazamiento isotrópico paramagnético (DIP) está compuesto del desplazamiento de contacto de Fermi (DCF) y el desplazamiento dipolar (DD)

$$(\Delta H/H)_{DIP} = (\Delta H/H)_{DCF} + (\Delta H/H)_{DD} \quad (3)$$

El término de contacto de Fermi involucra interacciones del momento de espín nuclear con el momento de la densidad de espín electrónico de los electrones desapareados de la siguiente manera:<sup>100</sup>

$$H_{CF} = A_S \mathbf{S} \cdot \mathbf{I} \quad (4)$$

donde  $A_S$  es la constante de acoplamiento hiperfino cuya magnitud refleja la cantidad de densidad de espines desapareados en relación con el núcleo, y cuyo signo indica la densidad de espín positiva o negativa.

$$A_S = (8\pi/3) \gamma_N g \beta \delta(\mathbf{r}); \quad (5)$$

donde  $\mathbf{r}$  es el vector que especifica la posición del electrón con respecto al núcleo.  $\delta(\mathbf{r})$  es la función delta de Dirac la cual toma un valor de 1 para  $\mathbf{r} = 0$  y cero para cualquier otro valor;  $\gamma_N$  es el radio de giro magnético del núcleo;  $g$  es el promedio de  $g$  rotacional para el complejo y  $\beta$  el magnetón del Bohr.<sup>100</sup>

El desplazamiento dipolar proviene de la interacción dipolar entre el momento magnético electrónico y el espín nuclear, lo que se da por:<sup>100</sup>

$$H_D = h \gamma_N g \beta \left\{ \frac{3(\mathbf{r} \cdot \mathbf{S})(\mathbf{r} \cdot \mathbf{I})}{r^5} - \frac{\mathbf{S} \cdot \mathbf{I}}{r^3} \right\} \quad (6)$$

Este término se hace cero para una distribución esférica de los electrones.

Con respecto a los estudios espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  de porfirinas-Fe(III), se han preparado complejos pentacoordinados para asegurar un alto espín de hierro(III)  $S = 5/2$ . También se forzó el bajo espín  $S = 1/2$  a partir de los complejos de alto espín, formando los respectivos complejos hexacoordinados con ligantes de campo fuerte. Esto mismo se hizo con peroxidasas, se prepararon modelos de ellas de alto espín partiendo de las enzimas en reposo, a pHs determinados y cuyos espectros de RMN de protón presentaban desplazamientos a las frecuencias más altas. Utilizando ligantes de campo ligante fuerte, se prepararon los modelos de peroxidasas de bajo espín. En las Tablas 12 y 13 se resumen los desplazamientos isotrópicos de complejos de porfirina-Fe(III) y de peroxidasas de alto y bajo espín, reportados por otros autores.

Tabla 12. Desplazamientos químicos de protón en RMN de complejos hierro(III)-porfirinas

Complejo	Espín	$\delta$ Me-hemo (ppm)				$\delta$ CH- vinilo (ppm)	Ref
[protoporfirina-Fe(III)(CN) $_2$ ] $^+$	1/2	14.30	13.95	10.55	9.31		104
[mesoporfirina-Fe(III)(CN) $_2$ ] $^+$	1/2	12.98	12.98	12.10	12.63		104
[deuteroporfirina-Fe(III)(CN) $_2$ ] $^+$	1/2	15.26	12.72	11.64	9.99		104
[protoporfirina-Fe(III)(H $_2$ O)(OH)] $^+$	5/2	49	47	43	41	34	*105
[mesoporfirina-Fe(III)] $^+$	5/2	62.3	62.3	60.6	60.6		99
[deuteroporfirina-Fe(III)] $^+$	5/2	64.3	61.2	59.8	57.4		99

\*Complejos hexacoordinados

Los desplazamientos isotrópicos que presentan los complejos modelo de porfirinas-hierro(III) (Tabla 12) reportados como de alto espín 5/2 se presentan en frecuencias  $>49$  ppm. Para peroxidases con Fe(III) alto espín 5/2 (Tabla 13) están en frecuencias  $>76$  ppm. En contraste, los complejos de porfirina-Fe(III) de bajo espín 1/2 se encuentran en frecuencias  $<16$  ppm, presentándose para los modelos de peroxidasa de bajo espín en frecuencias  $<40$  ppm.

Tabla 13. Desplazamientos químicos de los protones metil-hemo de peroxidases nativas

Enzima	Espín	RMN de $^1\text{H}$ Me-hemo (ppm)	Ref.
<i>Cloroperoxidasa</i>	5/2	76.6, 72.4, 65.3, 62.8	32, 106, 86
<i>Peroxidasa de horseradish</i>	5/2	79.4, 69.4, 65.8, 53.3	43, 85, 106, 92
<i>Cinereus peroxidasa</i>	5/2	87.0, 73.6, 65.8	107
<i>Cinereus peroxidasa</i>	1/2 ?	32.6, -22.6	107
<i>Cloroperoxidasa</i>	1/2 ?	39.2, 24.5, 24.0, 23.9	32, 86
<i>Peroxidasa de horseradish</i>	1/2 ?	30.12, 27.64	85, 106, 86

Con respecto al comportamiento de las peroxidases, en 1973 Maltempo *et al*<sup>7</sup> realizó estudios magnéticos de la *chromatium ferricitocromo c* peroxidasa. Algunos resultados fueron:  $\mu = 4.2 \mu_B$  y  $g = 4.75$  a una temperatura de 1.4 K, UV-Vis  $\lambda_{\text{Soret}} = 396-408$  nm con un hombro en 375 nm y otras bandas en 500, 535 y 635 nm. La banda en 635 tiende a desaparecer en la medida en que el pH se acerca a 7. A partir de los resultados obtenidos, Maltempo postuló un estado electrónico del hierro que es una mezcla cuántica de dos estados de espín puros el alto  $S = 5/2$  y el intermedio  $S = 3/2$ . La mezcla térmica  $S = 1/2$ ,  $S = 5/2$ , que es un comportamiento poco usual de las proteínas, resultaba inconsistente con los datos del comportamiento magnéticos.

A partir de la publicación de la investigación de Maltempo *et al*<sup>7</sup> se inició la síntesis de complejos de porfirina-Fe(III) que reprodujeran la mezcla cuántica de espín. En 1979, aparecen los primeros cinco complejos reportados por Reed *et al*<sup>32</sup> como modelos de espín mezclado cuánticamente 3/2, 5/2. En la Tabla 14 se presentan algunos datos de RMN de protón, encontrados en nuestros complejos y los reportados en otros trabajos, para complejos modelo de espín cuánticamente mezclado 3/2.

Tabla 14. Complejos de porfirina-Fe(III) como modelos de espín 5/2, 3/2 cuánticamente mezclado, reportados por otros autores.

Complejo	RMN de <sup>1</sup> H αCH <sub>2</sub> -hemo (ppm)	RMN de <sup>1</sup> H CH <sub>3</sub> -hemo (ppm)	RMN de <sup>1</sup> H H-pirrol (ppm)	Ref.
<sup>a</sup> Protoporfirina-Fe(III)-picdien 5	35.7	42.2	-	este trabajo
<sup>a</sup> Mesoporfirina-Fe(III)-picdien 6	33.6	40.3	-	este trabajo
<sup>a</sup> Protoporfirina-Fe(III)-CH <sub>3</sub> OH 1	51.6	71.4	-	este trabajo
<sup>a</sup> Mesoporfirina-Fe(III)-CH <sub>3</sub> OH 2	43.5	63.0	-	este trabajo
<sup>b</sup> [Tetrafenilporfinato-Fe(III)]-OReO <sub>3</sub>	-	-	60.0	89
<sup>c</sup> [Tetra- <i>m</i> -tolilporfinato-Fe(III)]OCIO <sub>3</sub>	-	-	36	34
<sup>b</sup> Octaetilporfinato-Fe(III)-C(CN) <sub>3</sub>	40.5/51.2	-	-	79
<sup>b</sup> Octaetilporfinato-Fe(III)-SO <sub>3</sub> CF <sub>3</sub>	34.6/49.4	-	-	79
<sup>b</sup> Etioporfirato-Fe(III)-SO <sub>3</sub> CF <sub>3</sub>	-	63.8	-	79
<sup>d</sup> [Tetrafenilporfinato-Fe(III)]-Ag(Br <sub>6</sub> CB <sub>11</sub> H <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	-	-	62	6
<sup>e</sup> [Tetrafenilporfinato-Fe(III)]-(CB <sub>11</sub> H <sub>12</sub> )	-	-	58.5	6
<sup>e</sup> [Tetrafenilporfinato-Fe(III)]-OReO <sub>3</sub>	-	-	66.7	6
<sup>b</sup> [Tetrafenilporfinato-Fe(III)]-OReO <sub>3</sub>	-	-	61.5	6

Disolventes: <sup>a</sup>CD<sub>3</sub>OD, <sup>b</sup>DCl<sub>3</sub>, <sup>c</sup>Tolueno-*d*<sub>8</sub>, <sup>d</sup>CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, <sup>e</sup>C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.

Los datos de la Tabla 14 llevan a la conclusión de que por espectroscopía de RMN de

<sup>1</sup>H los complejos **5** y **6** presentan una mezcla de cuántica de estados de espín 3/2, 5/2. Esta información se complementa con los desplazamientos isotrópicos de los protones meso en frecuencias negativas. Para el complejo **7** se observan dos grupos de señales que son características de una mezcla cuántica de estados de espín con  $\delta = 39.6-33.6$  ppm (Me-hemo) y  $\delta = -32.4$  ppm (meso-H) y el pico de los H-hemo en 76.4 ppm que corresponde a un alto espín (> 74 ppm). Se proponen dos especies de Fe(III) presentes en esa disolución, una de alto espín puro  $S = 5/2$  y la otra una mezcla cuántica de estados de espín  $S = 5/2, 3/2$ .

Para las porfirinas-Fe(III) de partida **1** y **2** es posible proponer también la presencia de por lo menos dos especies de Fe(III). Una caracterizada por los desplazamientos isotrópicos de los Me-hemo en  $\delta < 74$  ppm que corresponde a una mezcla cuántica de estados de espín 5/2, 3/2, y la otra con  $\delta = 47$  para los meso-H (para el complejo), señal que no se pudo observar para el complejo **2**, que demuestra la presencia de un Fe(III) alto espín puro 5/2. Esto es posible en virtud de que la inicial pentacoordinación del hierro(III) con Cl<sup>-</sup> en las porfirinas-Fe(III) cambia a una hexacoordinación con metanol cuando se disuelven en metanol. El espectro de RMN de protón para la deuteroporfirina-Fe(III) **3** únicamente presenta señales características de un estado puro de alto espín.

En la Tabla 11 aparece el factor de asimetría  $Q_{asim.} = (\text{Apertura de } \delta_{\text{CH}_3\text{-hemo}})/(\text{promedio } \delta_{\text{CH}_3\text{-hemo}})$  para cada una de las porfirina-Fe(III) y su complejo con picdien. Ese factor  $Q_{asim.}$  informa acerca de la anisotropía magnética que se presenta en el plano de la porfirina. Se ha observado que para los complejos de porfirina-Fe(III) de alto espín esta anisotropía es muy pequeña, con interacciones de contacto que dominan los desplazamientos. La apertura de los desplazamientos de los metil-hemo aumenta conforme aumenta el poder electroattractor de los sustituyentes periféricos 2,4-R (Figura 2) del macrociclo. Esto refleja una diferente deslocalización de espín en cada pirrol.<sup>99</sup> Para los grupos funcionales que tienen las

porfirinas que se utilizaron en esta investigación la asimetría magnética aumenta en el orden: etilo (0.03) < vinilo (0.10) ~ protón (0.16).<sup>99</sup>

Para los modelos de porfirina-Fe(III) bajo espín prácticamente el promedio de los desplazamientos isotrópicos de los metilo-hemo es independiente de los sustituyentes 2,4-R de la porfirina. La apertura de esos desplazamientos isotrópicos refleja directamente una redistribución del espín desapareado entre los cuatro pirroles, con *pequeña carga neta* en el enlace hierro-porfirina.<sup>99</sup>

El efecto de los sustituyentes 2,4-R sobre la asimetría en el plano de la porfirina-Fe(III) es el mismo para el bajo que para el alto espín, con las señales de los 1,3-metilos desplazándose a frecuencias más altas y las correspondientes a los 5,8-metilos a menores frecuencias como 2,4-R se vuelven más electroattractores.<sup>99</sup>

El valor de  $Q_{asim.}$  para los complejos de porfirina-pinza (5-7) que se reportan en este trabajo, así como de sus precursores están de acuerdo con los valores de porfirinas similares hexacoordinadas, reportadas por Budd et al.<sup>99</sup>

En la Figura 21 se presenta la variación de los desplazamientos isotrópicos de los diferentes grupos del complejo protoporfirina-Fe(III)-picdien con la variación de la temperatura absoluta T. En la Figura 22 se muestra la gráfica del comportamiento lineal de los desplazamientos isotrópicos vs.  $1/T$  para los complejos 5-7. Para los sustituyentes pirrólicos -CH<sub>3</sub>, -CH = CH<sub>2</sub>,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub> y 2,4-H se tienen líneas rectas cuya intercepción cuando  $1/T \rightarrow 0$  no es cero, indicando con ello una desviación del comportamiento Curie cercano al de otras porfirinas-Fe(III) hexacoordinadas reportadas por Budd *et al.*,<sup>99</sup> similares a la que se utilizaron en este trabajo.

La desviación del comportamiento Curie para el desplazamiento del grupo vinilo del compuesto **5** es muy grande (-15.88 ppm para  $1/T = 0$ ) y es cercano a la desviación que presentan las porfirinas de bajo espín  $1/2$ .<sup>99</sup>

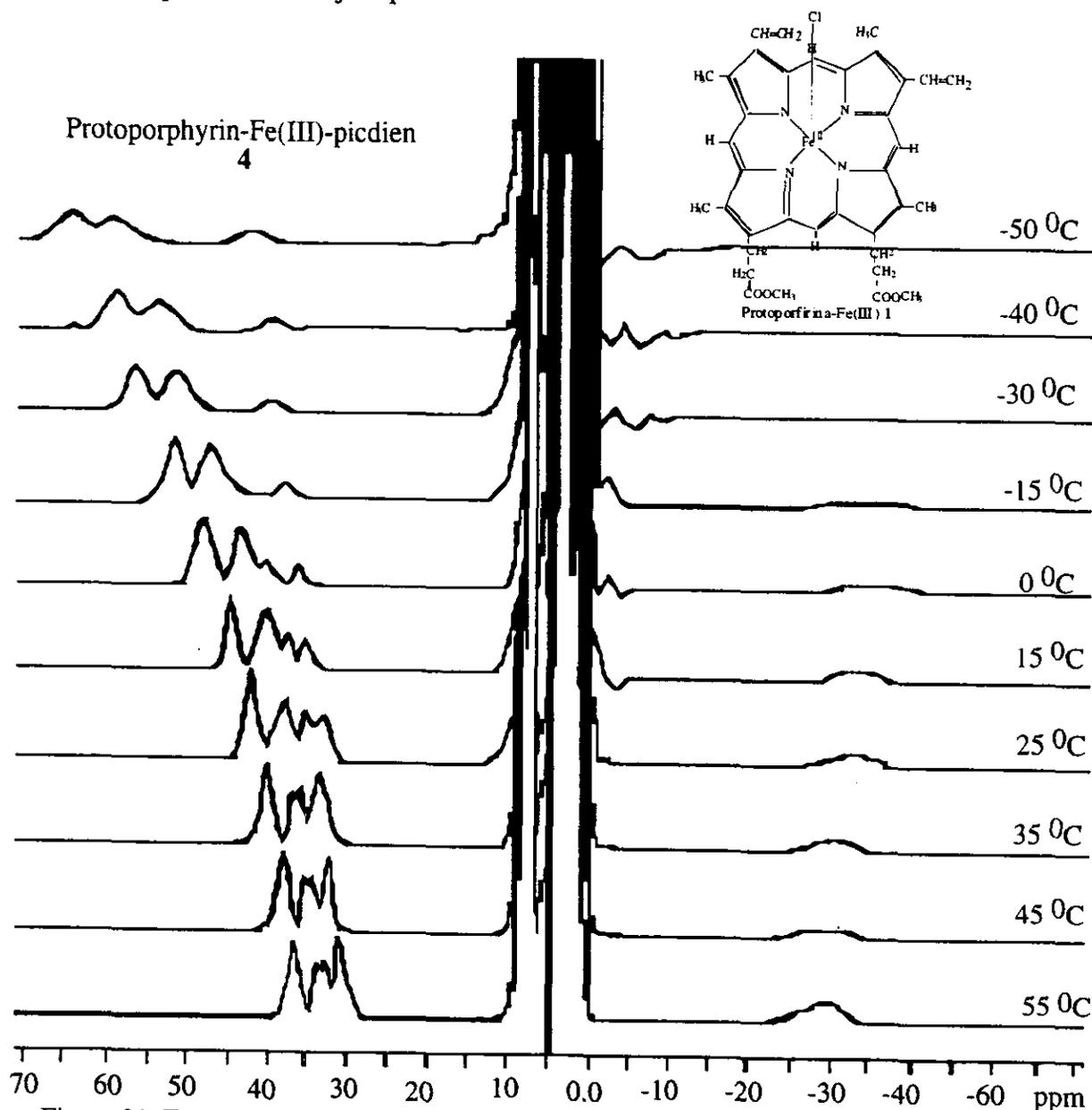


Figura 21. Espectro de RMN de protón de 500 MHz a temperatura variable del complejo protoporfirina-Fe(III)-picdien **5**. Se utilizaron  $CD_3OD$  como disolvente y  $Me_4Si$  como referencia.

Para los tres complejos **5-7** el desplazamiento negativo de los protones meso indican que el ligante picdien ha inducido un fuerte carácter de espín  $S = 3/2$ .

En la medida en que la temperatura es disminuida se observan algunas tendencias. El desplazamiento isotrópico de los metilos-hemo para los complejos **5** a **7** aumenta linealmente con una pendiente positiva, pero menos pronunciada que la pendiente de los protones pirrólicos (2,4) de la curva Curie para el compuesto **7**.

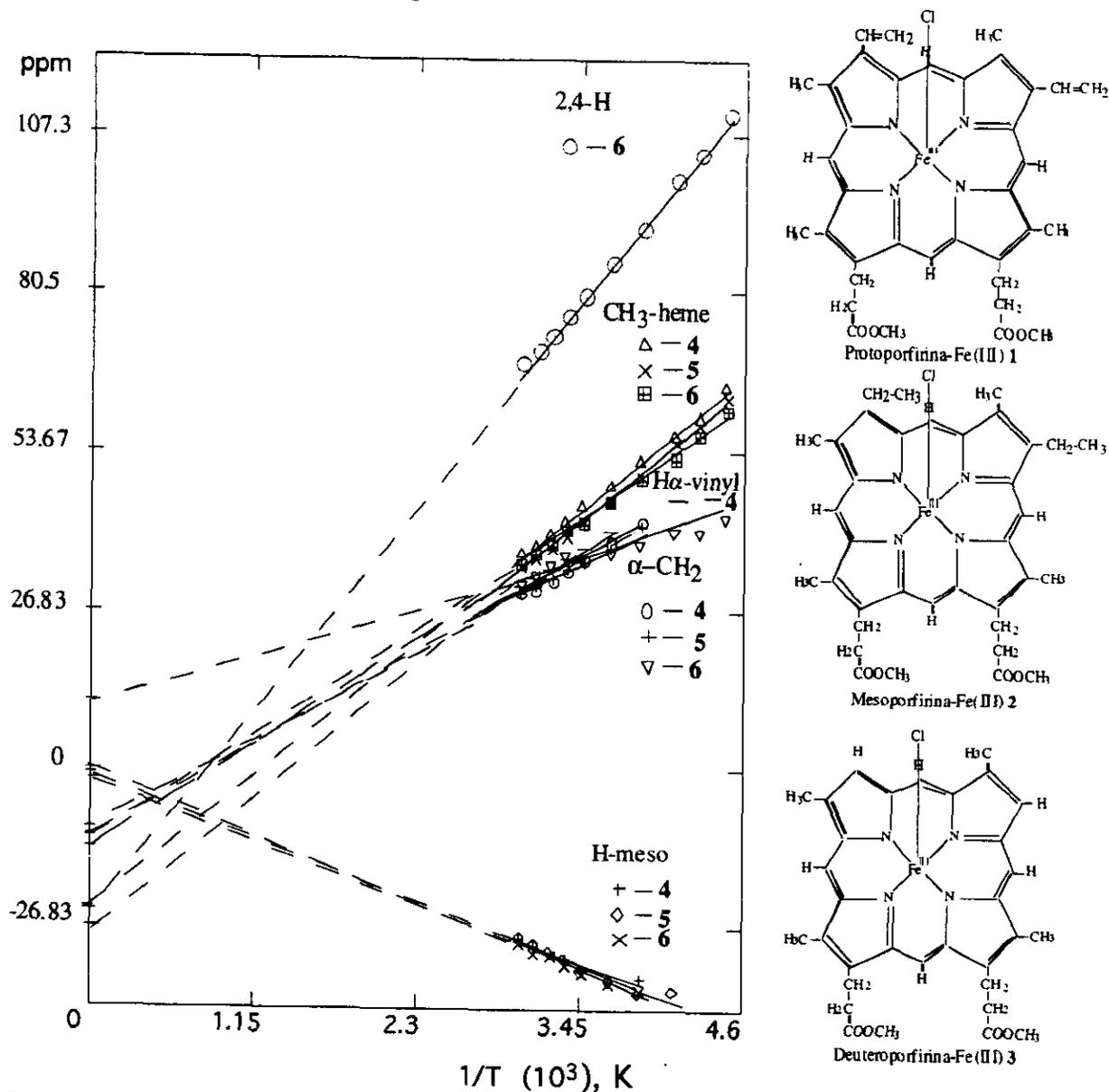


Figura 22. Gráficas del comportamiento Curie de las resonancias de CH<sub>3</sub>-hemo, H-meso, CH<sub>2</sub> = CH $\alpha$ -hemo, 2,4-H y  $\alpha$ -CH<sub>2</sub> para los complejos porfirina-Fe(III)-picdien **5-7**.

Con base en todos los estudios espectroscópicos de RMN de protón, los compuestos **5**

y **6** se proponen como complejos de Fe(III) hexacoordinados con el ligante axial picdien, con una especie en mayor proporción que presenta mezcla cuántica de estados de espín  $S = 3/2$ ,  $S = 5/2$  y otra especie con alto espín puro  $S = 5/2$ . El compuesto **7** parece ser un sistema hexacoordinado con Fe(III) en alto espín, predominantemente.

### II.3.4 Resonancia Paramagnética Electrónica.

Los espectros de RPE en banda X de los complejos **5-7** así como los correspondientes a las porfirinas-Fe(III) precursoras están en las Figuras 23-25.

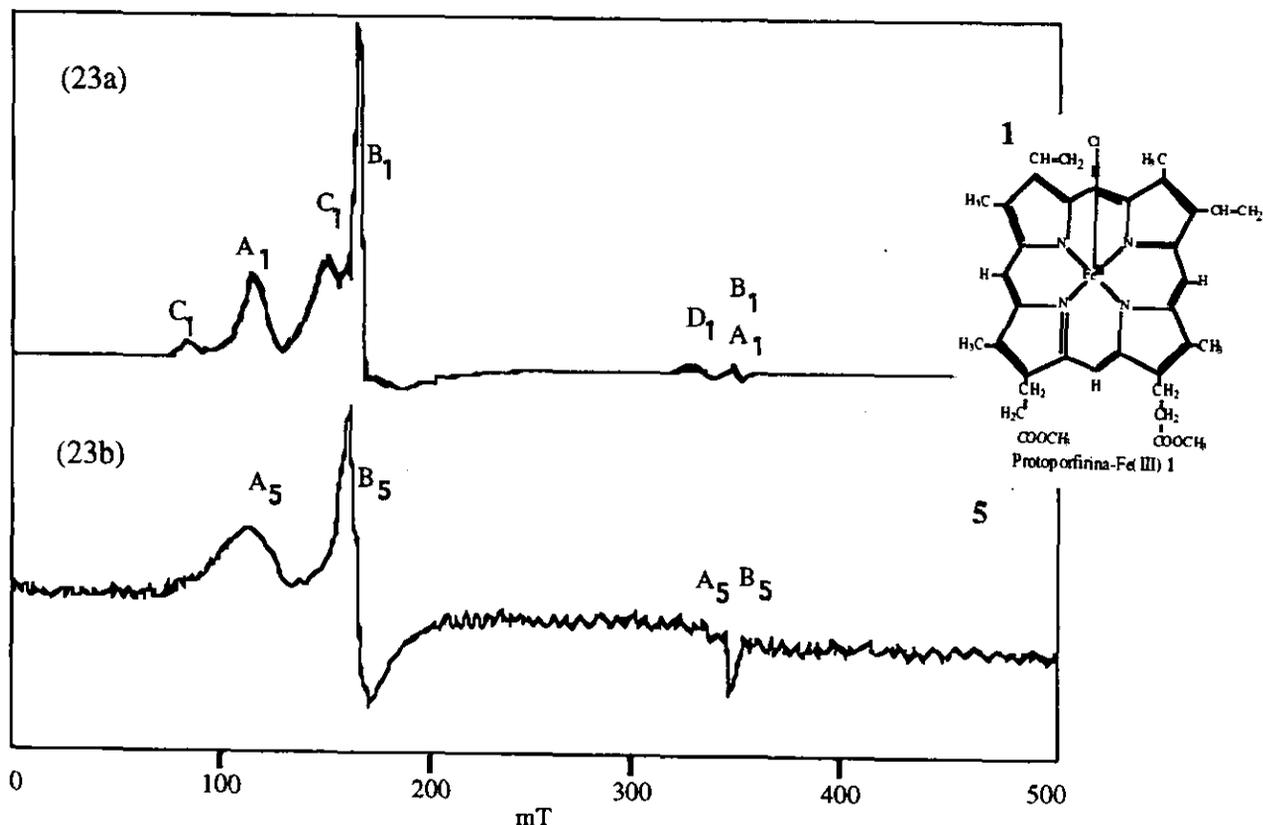


Figura 23. Espectro de (a) protoporfirina-Fe(III) con las señales  $A_1$ ,  $B_1$ ,  $C_1$  y  $D_1$ ; (b) protoporfirina-Fe(III)-picdien **5** con las señales  $A_5$  y  $B_5$ .

El espectro de RPE del compuesto **1**, protoporfirina-Fe(III), en la Figura 23a muestra varias señales que se han asignado a cuatro diferentes especies. Una especie axial  $A_1$  con  $g_{\parallel}^A = 1.924$  y  $g_{\perp}^A = 5.403$ . Otra especie axial  $B_1$ ,  $g_{\parallel}^B = 1.924$  y  $g_{\perp}^B = 4.000$  y una tercera especie axial  $C_1$  con  $g_{\parallel}^C = 7.955$  y  $g_{\perp}^C = 4.000 \pm 0.008$  y una especie de bajo espín  $D_1$ ,  $S = 1/2$ , con  $g \approx 2.0$ .

<sup>105</sup> Después de la adición de 0.20 mmoles de picdien a 0.20 mmoles protoporfirina se obtuvo el espectro de la Figura 23b. Este muestra dos especies axiales  $A_5$  y  $B_5$  con las correspondientes  $g_{\parallel}^A$

$= 1.990$  y  $g_{\perp}^A = 5.172$ , y  $g_{\parallel}^B = 1.951$ ,  $g_{\perp}^B = 4.072$ . Las especies de bajo espín  $C_1$  y  $D_1$  protoporfirina precursora han desaparecido en este complejo.

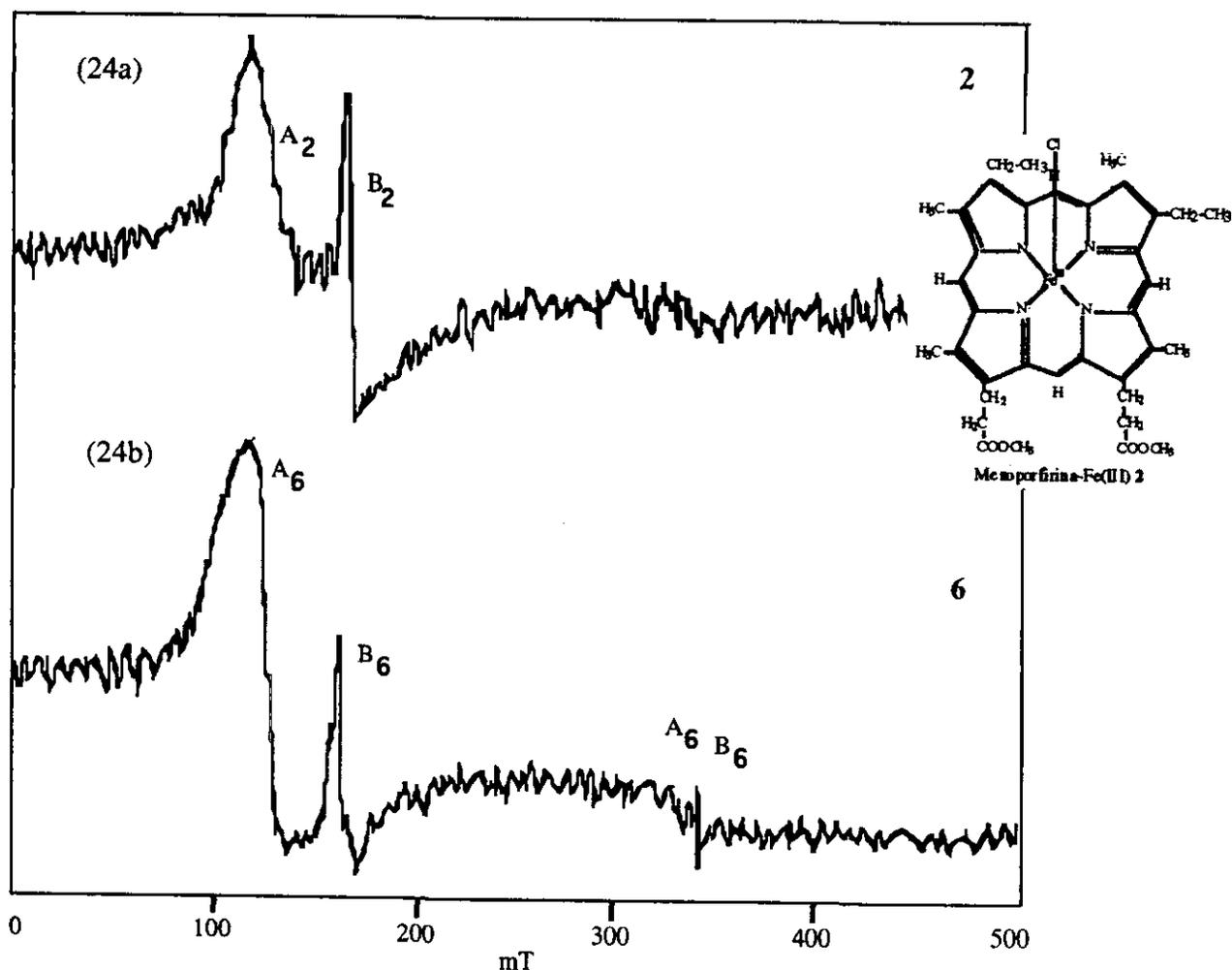


Figure 24. Espectro de EPR de (a) mesoporfirina-Fe(III) **2** con las señales  $A_2$ ,  $B_2$ ,  $C_2$  y  $D_2$ ; (b) mesoporfirina-Fe(III)-picdien **6** con las señales  $A_6$  y  $B_6$ .

El cambio del espectro de RPE de la protoporfirina-Fe(III) cuando se le adiciona el picdien implica una gran alteración por el ambiente del ligante cuando se coordina en el sitio del hierro.

El espectro de RPE del complejo mesoporfirina-Fe(III) en la Figure 24a muestra dos señales  $A_2$  y  $B_2$  con  $g_{\perp}^A = 4.890$  y  $g_{\perp}^B = 3.992$ . Después de adicionar 0.20 mmoles del ligante picdien a

0.20 mmoles mesoporfirina-Fe(III), se observa el espectro de la Figura 24b con dos especies axiales  $A_6$  y  $B_6$  con  $g_{\parallel}^A = 1.987$ ,  $g_{\perp}^A = 5.222$  y  $g_{\parallel}^B = 1.953$ ,  $g_{\perp}^B = 4.067$ .

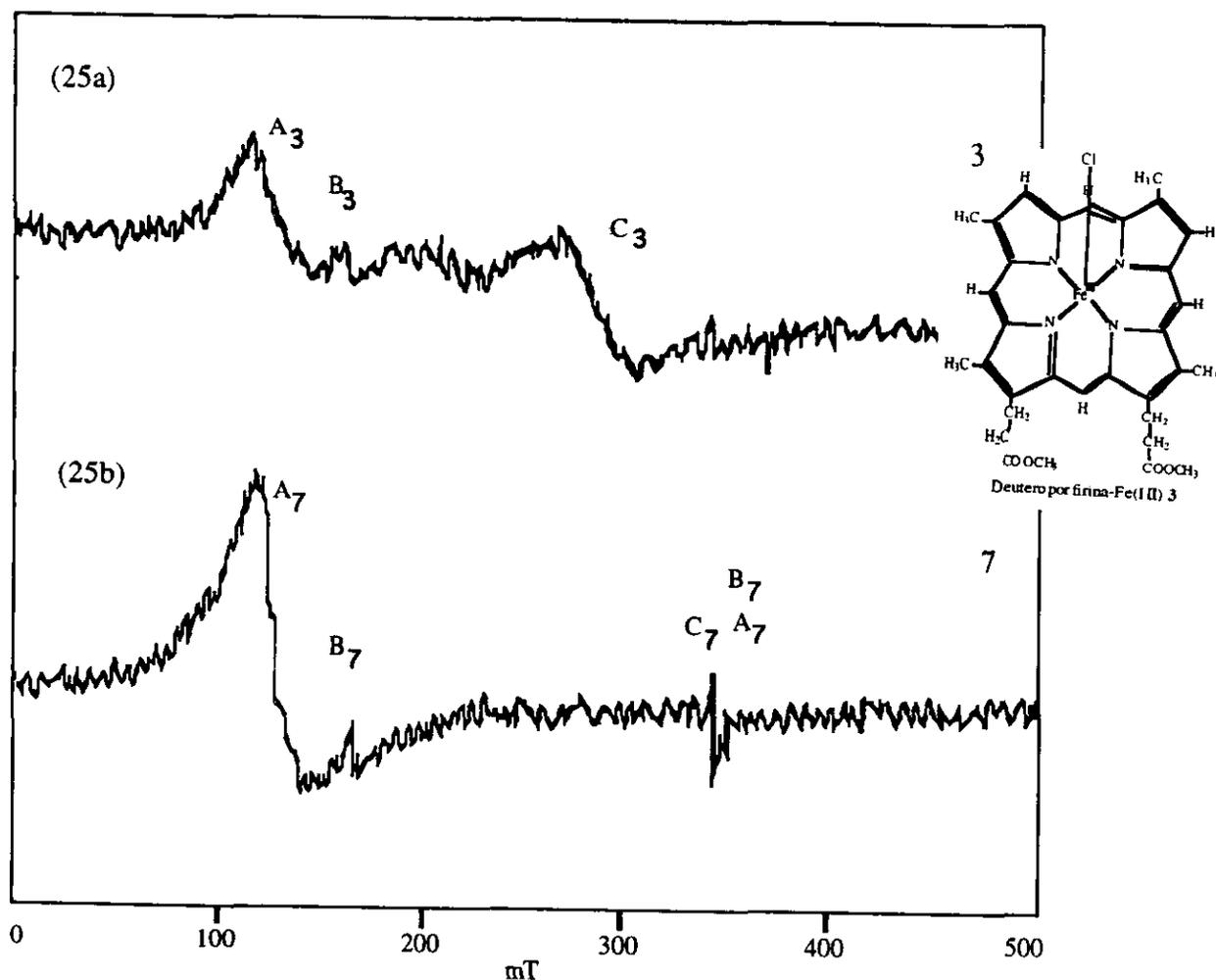


Figure 25. Espectro de RPE de (a) deuteroporfirina-Fe(III) **3** con las señales  $A_3$ ,  $B_3$ , y  $C_3$ ; (b) deuteroporfirina-Fe(III)-picdien **7** con las señales  $A_7$ ,  $B_7$  y  $C_7$ .

En la Tabla 15 se resumen los datos de los espectros de RPE de los complejos **5-7** que se reportan en este trabajo, así como los de los correspondientes a las porfirinas-Fe(III) iniciales.

Como se puede observar en la Tabla 15 que contiene los datos de los espectros de RPE de los complejos porfirina-pinza que se reportan en este trabajo, los valores de  $g_{\parallel}$  y  $g_{\perp}$  para el Fe(III) son diferentes de los que se esperarían para estados puros de espín  $5/2$  y  $1/2$ .<sup>108-117</sup> Para  $g_{\perp}$  los

valores  $6 \leq g_{\perp} \leq 4$  de los complejos 5-7 están de acuerdo a las especies de Fe(III) reportadas con mezcla cuántica de estados de espín  $S = 3/2$ ,  $S = 5/2$ .<sup>6,7,9,34,75-80</sup>

Tabla 15 . Espectros de RPE de los complejos porfirinas-Fe(III)-picdien preparados en este trabajo y de las porfirinas-Fe(III) precursoras.

Complejos	especie A		especie B		especie C		especie D
	$g_{\parallel}$	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	$g_{\perp}$	$g_{iso}$
protoporfirina-Fe(III)						4.000 ±	
1	1.924	5.403	1.924	4.000	7.955	0.008	2.000
protoporfirina-Fe(III)- picdien							
5	1.990	5.172	1.951	4.072			
mesoporfirina-Fe(III)							
2		4.890		3.992			
mesoporfirina-Fe(III)- picdien							
6	1.987	5.222	1.953	4.067			
deuteroporfirina-Fe(III)							
3		5.137		4.117	2.316		
deuteroporfirina-Fe(III)- picdien							
7	1.957	5.238	1.957	4.100	2.000		

Los espectros de RPE se obtuvieron a 77 K en soluciones metanólicas. Las soluciones se prepararon con las porfirinas-Fe(III) progenitoras y se obtuvieron los espectros correspondientes. Posteriormente en esas mismas soluciones se adicionó el compuesto picdien para nuevamente obtener los espectros de RPE.

En 1974 Maltempo<sup>7</sup> propone que una mezcla de estados de espín en una hemoproteína se refiere a un sistema cuya función de onda que representa su configuración electrónica contiene contribuciones importantes de dos o más diferentes estados de espín. En contraste, en la mezcla térmica de estados de espín, las moléculas de proteína pueden ser monitoreadas en dos estados de espín puros, magnéticamente distinguibles. Una molécula de proteína que tiene una mezcla cuánticamente mezclada de estados de espín correspondería a una especie magnética con propiedades magnéticas distintas de las especies puras.

El mecanismo más frecuentes para la mezcla de estados de espín en complejos hemo es la interacción espín-órbita. Las reglas de selección para la interacción espín-órbita entre diferentes estados de espín de hierro-hemo son: i)  $\Delta S = 0, \pm 1$  y ii)  $\Delta S_z = 0, \pm 1$ .<sup>7</sup>

Para complejos hemo-Fe(III) la primera regla de selección indica que mientras un estado de espín intermedio puede ser mezclado a primer orden con estados de alto espín o bajo espín, los estados de alto y bajo espín no pueden mezclarse entre sí a primer orden. Es por esta razón que probablemente la mezcla térmica de estados de alto y bajo espín sea común en proteínas férricas, no así la mezcla cuántica de estos estados. Sin embargo, aún cuando la mezcla cuántica de estados de espín sea permitida por las reglas de selección, esto ocurrirá si la separación de energía ( $\Delta$ ) entre estados de espín puros no perturbados es comparable o menor que la constante de acoplamiento espín-órbita ( $\lambda \sim 300 \text{ cm}^{-1}$  en complejos férricos; Figura 26).<sup>7,9</sup>

En términos de los orbitales  $d$ , el cuarteto corresponde a una configuración  $d_{xy}^2 d_{xz}^1 d_{yz}^1 d_z^2$ , donde los orbitales  $d_{xz}$  y  $d_{yz}$  son degenerados. Al sexteto completamente asimétrico  ${}^6A_1$  le corresponde la configuración electrónica:  $d_{xy}^1 d_{xz}^1 d_{yz}^1 d_z^2 d_{x^2-y^2}^1$ .<sup>6</sup>

La Figura 26 (a) describe la situación de las hemoproteínas con hierro(III) en alto espín, tal como la met-mioglobina, donde en la ausencia de acoplamiento espín-órbita el estado  ${}^6A_1$  no perturbado queda  $2000 \text{ cm}^{-1}$  abajo del estado  ${}^4A_2$  no perturbado. El acoplamiento espín-órbita entre los estados es el familiar desdoblamiento de los dobletes de Kramers 2D y 4D en el estado  ${}^6A_1$ , con mezclas mínimas ( $\sim 3\%$ ) del estado excitado  ${}^4A_2$ . La Figura 26 (b) muestra la correspondiente configuración para el estado  ${}^4A_2$  no perturbado que se encuentra  $2000 \text{ cm}^{-1}$  abajo del estado  ${}^6A_1$ . La Figura 26 (c) describe la situación en el *ferricitocromo c'* donde  $\Delta \ll \lambda$  ( $\lambda$  normalmente sería del orden de cientos de  $\text{cm}^{-1}$ ). El estado  ${}^4A_2$  no perturbado se ha dibujado abajo del estado  ${}^6A_1$ , como en la proteína *chromtium*., no obstante que el inverso es posible para el *ferricitocromo c'*.

En la Figura 27 se tiene la gráfica en la que se muestra la cantidad relativa de alto espín y de espín intermedio a los dobletes de Kramers del estado base  $\psi_1^\pm$ , graficada como función de  $\Delta/\lambda$ . Cuando  $\Delta = 0$ ,  $\psi_1^\pm$  es una mezcla de 50% de dobletes de alto espín y de espín intermedio. Para un valor grande de  $\Delta/\lambda$  la composición de  $\psi_1^\pm$  se aproxima al estado puro de espín intermedio o al doblete de puro alto espín, dependiendo del signo de  $\Delta$ . Para un valor dado de  $\Delta/\lambda$  el doblete  $\psi_2^\pm$  está compuesto de una mezcla de espines alto e intermedio comparable con la composición del doblete de estado base  $\psi_1^\pm$ ; sin embargo, el doblete  $\psi_2^\pm$  está más cercano a un doblete de espín puro grande y positiva y (c)  $\Delta/\lambda < 1$ . Los dobletes de espín mezclado están marcados por unos asteriscos. La cantidad de mezcla del sexto o del cuarteto a las eigenfunciones debido a que los elementos de la matriz de mezcla tienen una pequeña componente de la interacción espín-órbita. Los dobletes  $\psi_4^\pm$  y  $\psi_5^\pm$  son los complementos a la mezcla de estados de espín de los dobletes  $\psi_1^\pm$  y  $\psi_2^\pm$ . Por ejemplo, si el doblete  $\psi_1^\pm$  está compuesto de 80% de  $|^4A_2 \pm 1/2\rangle$  20% de  $|^6A_1 \pm 1/2\rangle$ , entonces  $\psi_5^\pm$  estaría compuesto de 20% de  $|^4A_2 \pm 1/2\rangle$  y 80% de  $|^6A_1 \pm 1/2\rangle$ .<sup>7,9</sup>

Cuando se aplica un campo magnético externo perpendicular al eje de orden cuatro, para una simetría  $C_{4v}$ , solamente los dobletes de Kramers  $\psi_1^\pm$  y  $\psi_5^\pm$  son desdoblados a primer orden. Se demuestra que si se escribe la función de onda para el estado mezclado  $\psi_n^\pm = a_n |^6A_1 \pm \frac{1}{2}\rangle + b_n |^4A_2 \pm \frac{1}{2}\rangle$  ( $a$  y  $b$  son coeficientes de mezcla), entonces  $g_{n\perp} = 6a_n^2 + 4b_n^2$ , para  $n = 1, 5$ . En este caso los dobletes  $\psi_2^\pm$ ,  $\psi_3^\pm$  y  $\psi_4^\pm$  no se desdoblan, y tienen un valor de  $g_\perp = 0$  para los tres dobletes. En la presencia de un campo magnético externo paralelo al eje principal de orden cuatro los cinco dobletes de Kramers se desdoblan. Sin embargo, las reglas de selección del dipolo magnético permiten transiciones con microondas solamente dentro de los dobletes de Kramers  $\psi_1^\pm$  y  $\psi_5^\pm$ , para los cuales  $g_{\parallel} = 2$ , independientemente de los

coeficientes de mezcla y de  $\Delta/\lambda$ .<sup>7</sup>

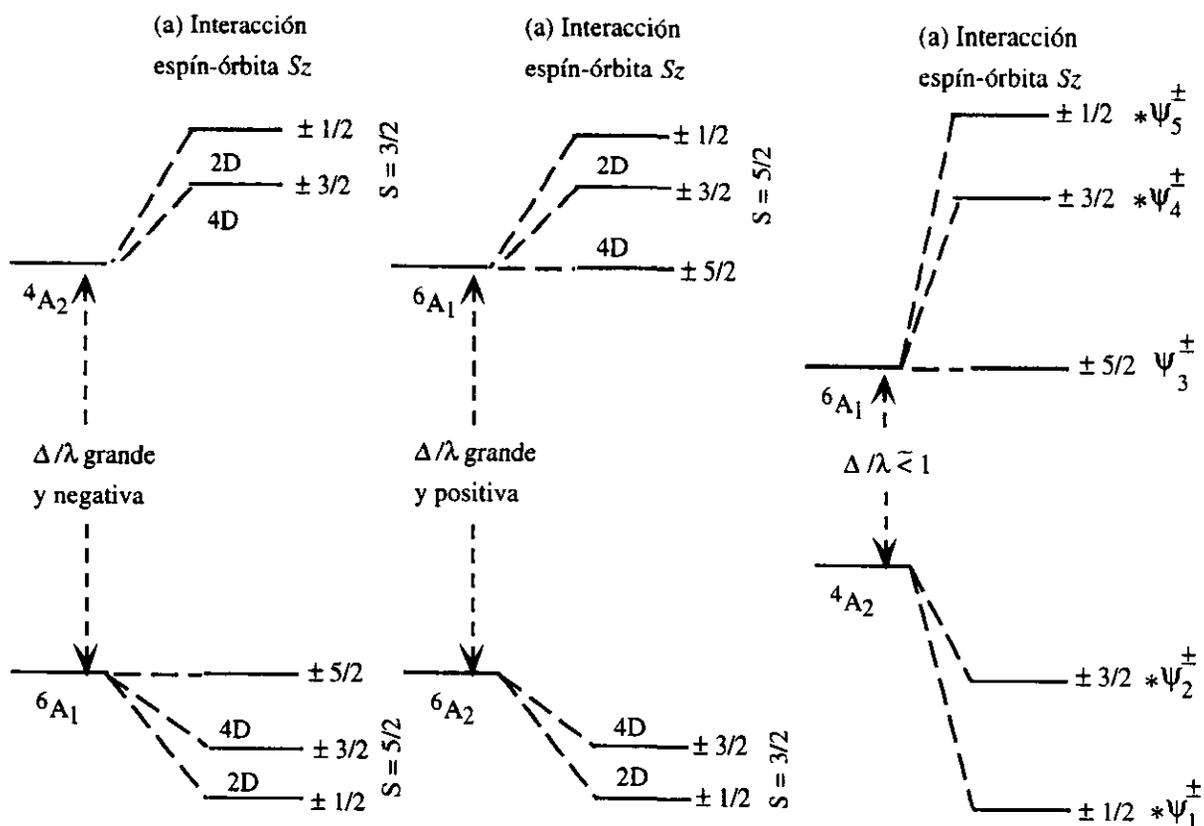


Figura 26. Niveles de energía para estados electrónicos de hierro-hemo en la presencia de un campo cristalino tetragonal y un acoplamiento espín-órbita: (a)  $\Delta/\lambda$  grande y negativa, (b)  $\Delta/\lambda \psi_1^\pm, \psi_2^\pm, \psi_3^\pm, \psi_4^\pm$  y  $\psi_5^\pm$ , así como a los correspondientes eigenvalores de energía, depende únicamente del valor de la relación  $\Delta/\lambda$ .<sup>7,9</sup>

Sabiendo que los dobletes  $\psi_1^\pm$  y  $\psi_5^\pm$  presumiblemente tienen una mezcla importante de los estados  $6A_1$  y  $4A_2$ , y que la separación entre los dobletes  $\psi_1^\pm$  y  $\psi_5^\pm$  debe ser del orden de  $2\lambda$ , consecuentemente, a una temperatura  $\leq$  ambiente, el doblete únicamente poblado con una transición permitida en EPR sería el doblete estado base  $\psi_1^\pm$ . La Figura 28 muestra la gráfica de  $g_\perp$  en función de  $\Delta/\lambda$  para el doblete de Kramers  $\psi_1^\pm$ .<sup>7,9</sup>

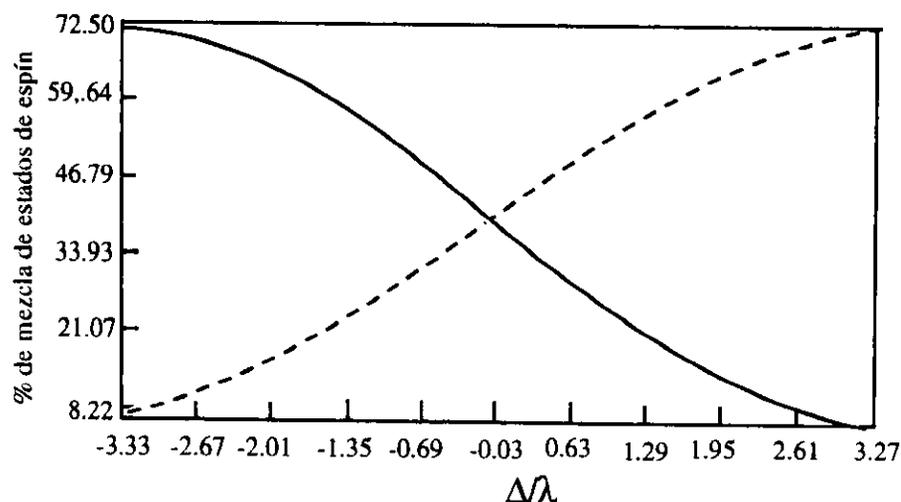


Figura 27. Mezcla de alto y bajo espines al doblete de Kramers del estado base, graficado como una función de  $\Delta\lambda$ .<sup>9</sup>

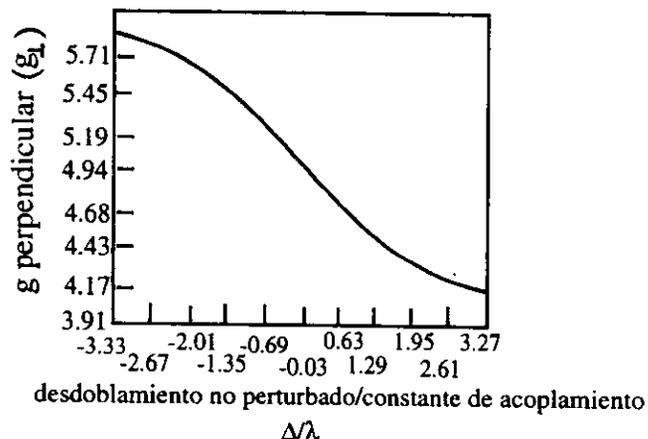


Figura 28. Valor de  $g_{\perp}$  del doblete estado base graficada en función de  $\Delta\lambda$ .<sup>7</sup>

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, los estudios de RPE de los nuevos complejos reportados en este trabajo: protoporfirina-Fe(III)-picdien **5**, mesoporfirina-Fe(III)-picdien **6** y deuteroporfirina-Fe(III)-picdien **7** (Figuras 23-25), nos darán información cuantitativa de los porcentajes de mezclas cuánticas de estados de espín 1/2 y 5/2. Haciendo una inspección de esos espectros, se pueden establecer algunas diferencias y algunas similitudes entre los espectros de porfirinas-Fe(III) sin picdien y con picdien:

1). Para las hierro-porfirinas precursoras **1-3** tienen diferencias entre ellos, indicando claramente el

efecto particular que los sustituyentes periféricos de cada porfirina tiene sobre el estado electrónico y magnético del hierro(III). Más precisamente, los compuestos 1-3 estabilizan especies similares marcadas como  $S_1^{A'}$ ,  $S_1^{B'}$ ,  $S_2^{A'}$ ,  $S_2^{B'}$ ,  $S_3^{A'}$ ,  $S_3^{B'}$  que se resumen en la Tabla 15.

2). En los tres casos la adición del ligante picdien cambia la respuesta de RPE sustancialmente, con una marcada simplificación de éstos que ahora están formados por un par de especies axiales A y B para cada compuesto 5-7.

3). Las señales A y B de los complejos con picdien 5-7 tienen valores espectroscópicos de  $g: g_{\perp}^A = [5.16 - 5.22]$ ,  $g_{\perp}^B = [4.062 - 4.072]$ , lo que indica que las especies  $A_5$ ,  $A_6$  y  $A_7$  son muy semejantes entre sí, independientemente de los sustituyentes particulares, una vez que el ligante picdien forma parte del complejo. En la misma tónica las especies  $B_5$ ,  $B_6$  y  $B_7$  son más parecidas.

Lo anterior permite proponer que el ligante axial picdien tiene la habilidad, cuando se coordina a estas porfirinas de producir solamente dos campos ligantes (A y B) que rodean al Fe(III) en estos complejos y que no corresponden a especies de alto espín puro  $S = 5/2$  o a espín intermedio puro  $S = 3/2$ .<sup>6,11,75-79</sup>

Bajo una selección de parámetros el hamiltoniano apropiado y comúnmente utilizado para racionalizar estos sistemas es:

$$H = \beta e S \cdot g \cdot H + D [S_z^2 - S(S+1)/3] + E (S_x^2 - S_y^2) \quad (7)$$

donde  $D$  y  $E$  son parámetros que determinan el desdoblamiento de campo cero y provienen de distorsiones axial y rómbica, respectivamente.<sup>108-110</sup>

En la Tabla 15, que resume los datos de EPR de los complejos preparados en este trabajo, se puede observar que los valores de  $g_{\perp}$  están de acuerdo a lo esperado para un sistema de Fe(III)

con mezcla cuántica de espines 5/2, 3/2:  $6 \leq g_{\perp} \leq 4.8$ .<sup>11</sup> Siguiendo la línea de análisis de Maltempo<sup>7,9</sup> y Reed<sup>6,34</sup> y las curvas de correlación del % de mezcla vs. campo cristalino no perturbado ( $\Delta/\lambda$ ) (Figura 27) y de  $g_{\perp}$  vs.  $\Delta/\lambda$  (Figura 28), se encuentra que para los complejos 5-7 el valor de  $\Delta/\lambda$  es:  $(\Delta/\lambda)_A = -0.40, -0.69$  y  $-0.33$ , respectivamente. Para  $(\Delta/\lambda)_B = 3.27$  para los tres complejos. Los correspondientes porcentajes de mezcla (% a) son:  $(\% a)_A = 56, 64$  y  $53$  respectivamente, y  $(\% a)_B < 8$  para los tres complejos.

Claramente el porcentaje de mezcla (% as) de las señales A es más grande que para las señales B, lo que muestra una muy pequeña pero considerable mezcla del estado  $|5/2\rangle$  dentro del estado  $|3/2\rangle$ .

Las estructuras cristalinas de complejos con porfirina-Fe(III)<sup>73-76</sup> muestran claramente una correlación entre el estado de espín y la posición del ion férrico fuera del plano de la porfirina. Los complejos con Fe(III) en estado de alto espín  $S = 5/2$  tienen al ion metálico fuera del plano del macrociclo  $\sim 0.3-0.5 \text{ \AA}$ <sup>7,113</sup> y compuestos con estado de bajo espín  $S = 1/2$  tienen al hierro casi en el plano de la porfirina, todos los otros estados de espín lo tienen en una posición intermedia fuera del plano porfirínico. Para las especies paramagnéticas A y B estabilizadas por el ligante picdien axialmente coordinado a las tres diferentes porfirinas 5-7, correspondería al Fe(III) una posición intermedia fuera del plano de la porfirina a la especie A y para la especie B la posición sería muy cerca del plano.

Otro dato que se obtuvo de los espectros de RPE de los complejos porfirina-pinza estudiados en este trabajo, es que la relación de áreas (B/A) de las señales A y B sigue el orden  $(B/A)_5 > (B/A)_6 > (B/A)_7$ . Esto significa que la especie B, que tiene menor proporción de estado de espín 5/2 en la mezcla con el 3/2, es mayor en el complejo  $5 > 6 > 7$ , indicando con ello que en el complejo protoporfirina-Fe(III)-picdien 5 hay una mayor proporción de la especie con el ion férrico más cerca del plano de la porfirina, que en los otros dos complejos, mesoporfirina-Fe(III)-

picdien 6 y deuteroporfirina-Fe(III)-picdien 7.

En la Tabla 16 se resume la información de RPE de algunas enzimas peroxidasa y de complejos de porfirina-Fe(III) obtenidos por otros grupos de investigación para compararlos con los resultados obtenidos para los complejos porfirina-pinza estudiados en este trabajo.

Tabla 16. Datos de RPE de enzimas peroxidasa y complejos de porfirina-Fe(III) estudiados por otros autores para compararlos con los datos obtenidos en este trabajo.

Enzima o complejo	Espín	RPE g1, g2, g3, g4	Ref.
protoporfirina-Fe(III)-picdien	5 3/2, 5/2	5.17, 4.07, 1.99, 1.95	este trabajo
mesoporfirina-Fe(III)-picdien	6 3/2, 5/2	5.22, 4.06, 1.99, 1.95	este trabajo
deuteroporfirina-Fe(III)-picdien	7 3/2, 5/2	5.24, 4.10, 1.96, 1.96	este trabajo
<i>peroxidasa de horseradish</i>	3/2, 5/2	6.35, 5.65, 2.0	43, 85
<i>lignina peroxidasa</i>	3/2, 5/2	5.86, 5.43, 1.99	107, 114
<i>mielo peroxidasa</i>	3/2, 5/2	7.04, 5.07, 1.95	115
<i>cinereus peroxidasa</i>	3/2, 5/2	5.59, 1.98	107
[protoporfirina-Fe(III)-(H <sub>2</sub> O)] <sup>+</sup>	5/2, 3/2	6.1, 5.6, 2.0	105
[tetrafenilporfirina-Fe(III)-(OCIO) <sub>3</sub> ]	5/2, 3/2	5.84, 1.98	42
[protoporfirina-Fe(III)-(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	5/2	6.0, 2.05	100
protoporfirina-Fe(III)-Cl	5/2	6.0, 2.0	115
<i>cinereus peroxidasa</i>	1/2	2.0	107
<i>peroxidasa de horseradish</i>	1/2	2.9, 2.1, 1.6	85, 86
[protoporfirina-Fe(III)(CN <sup>-</sup> ) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	1/2	2.92, 2.27, 1.53	116.

Se puede concluir a partir de la información de la Tabla 16 que los complejos 4-6 son excelentes modelos de RPE de enzimas peroxidasa estudiadas en estado de reposo. Los valores

de  $g$  para esas enzimas son característicos de estados de espín cuánticamente mezclados  $S = 5/2$ ,  $S = 3/2$ . Los modelos de porfirina-Fe(III) con estados de espín mezclado propuestos por otros autores, y los presentados en esta investigación tienen las posiciones y formas de las señales en los espectros de RPE de especies con estados de espín mezclados, que se habían observado únicamente en las peroxidasas nativas.

## II. 4. Caracterización espectroscópica del complejo Cu(II) obtenido. Discusión y conclusiones.

Para ampliar los estudios espectroscópicos de los nuevos complejos porfirinas-Fe(III)-picdien (5-7), que se reportan en este trabajo como modelos de peroxidasas, se procederá a realizar estudios de los complejos homólogos de Cu(II), como en otros trabajos de investigación se ha hecho.<sup>117,118</sup> La propuesta en esta parte del trabajo de investigación es observar por espectroscopías de UV-Vis y RPE, principalmente, si se coordina el picdien al Cu(II) de la clorina-Cu(II); comprobar si es una penta- o hexa-coordinación; el efecto que tiene el ligante axial picdien sobre la estructura electrónica y magnética de la clorina; de ser posible, medir el efecto que tiene la pinza sobre la distorsión del plano de la clorina. Estos estudios se podrán hacer siempre y cuando el espectro de RPE de los complejos clorina-Cu(II) sin picdien y con picdien presente interacción hiperfina y superhiperfina.<sup>82,119-127</sup>

### II.4.1 Ultravioleta-Visible.

El espectro de UV-Vis de la clorina-Cu(II) (clorofilina) 4 y del complejo clorina -Cu(II)-picdien 8 se muestran en la Figura 29. Para el compuesto 4 el pico del Soret se encuentra en 403.81 nm ( $24\,764\text{ cm}^{-1}$ ), con otras cuatro señales en 500.15 nm ( $19\,994\text{ cm}^{-1}$ ), 538 nm ( $18\,587\text{ cm}^{-1}$ ), 580 nm ( $17\,241\text{ cm}^{-1}$ ) and 626.80 nm ( $15\,954\text{ cm}^{-1}$ ). La última línea de las cuatro últimas es ocho veces más intensa que las tres anteriores. El compuesto 8 tiene una banda de Soret intensa en 404.61 nm ( $24\,715\text{ cm}^{-1}$ ), desplazada a energía más baja por 0.02 nm ( $50\text{ cm}^{-1}$ ) con respecto al compuesto 4. Sus bandas Q están en (a') 465.00 nm ( $21\,505$ ), (b') 552.85 nm ( $18\,089$ ), (c') 583.02 nm ( $17\,152$ ) y (d') 628.81 nm ( $15\,903\text{ cm}^{-1}$ ). Las cuatro bandas Q del compuesto 8 se encuentran en diferentes frecuencias.

El hecho de que ambos compuestos muestren cuatro bandas Q en lugar de las dos esperadas para un complejo ( $D_{4h}$ ) con cuatro átomos de nitrógeno equivalentes, indica que los cuatro átomos de nitrógenos no son equivalentes reflejando la presencia de un plano distorsionado con una simetría  $D_{2h}$ .<sup>28,74</sup> Ambos compuestos tienen sus cuatro bandas Q

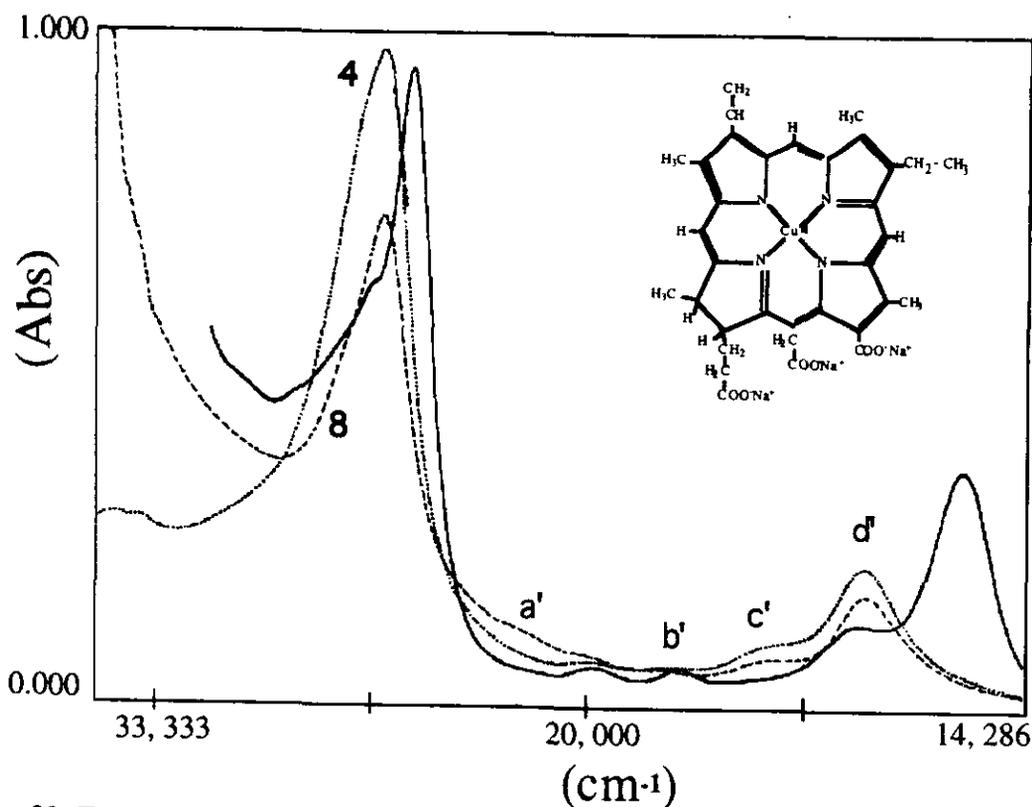


Figura 29. Espectros de UV-Vis de los complejos: clorina desmetalada (—); clorina-Cu(II) **4** (···) y clorina-Cu(II)-picdien **8** (- - -).

desplazadas hacia energías más altas con respecto a las bandas *Q* que no contienen cobre(II) (Figura 33). Athappan *et al*<sup>119</sup> reportaron que la banda *Q* alrededor de 625 nm (16 000 cm<sup>-1</sup>) es característica de una geometría octaédrica tetragonalmente distorsionada, en complejos hexadentados con bases de schiff. Los complejos **4** y **8** tienen bandas similares, lo que indica el mismo tipo de distorsión de su geometría. Consecuentemente las energías electrónicas de los orbitales moleculares metal-ligante están desplazadas unas con respecto a las otras. Esto significa que tienen diferentes grados de deslocalización del electrón desapareado. El espectro de UV-Vis del compuesto **8** es menos intenso que el espectro del compuesto **4**, indicando que para el compuesto **8** las transiciones con transferencia de carga tienen un menor coeficiente de extinción molar por una disminución de la probabilidad de la transición. Esto último podría deberse a una reducción de la disponibilidad de la densidad de carga para la transferencia de carga del ligante al ion metálico por una mayor deslocalización electrónica. Si este fuera el caso, los espectros de RPE de cada complejo deberían dar información sobre este punto.<sup>62</sup>

## II.4.2 Dicroísmo Circular Magnético.

En la Figura 30 se muestran los espectros de DCM de los complejos clorina-Cu(II) **4** y clorina-Cu(II)-picdien **8**. La banda de Soret es positiva para ambos complejos y muy semejante a la de los espectros UV-Vis. Las bandas *Q* que son cuatro, tienen diferencias entre ellas, las dos que se encuentran en energías más bajas están perfectamente definidas, las otras dos más cercanas al Soret no se resuelven muy bien, como en los espectros de UV-Vis, cambiando de signo la que se encuentra cerca de los 600 nm.

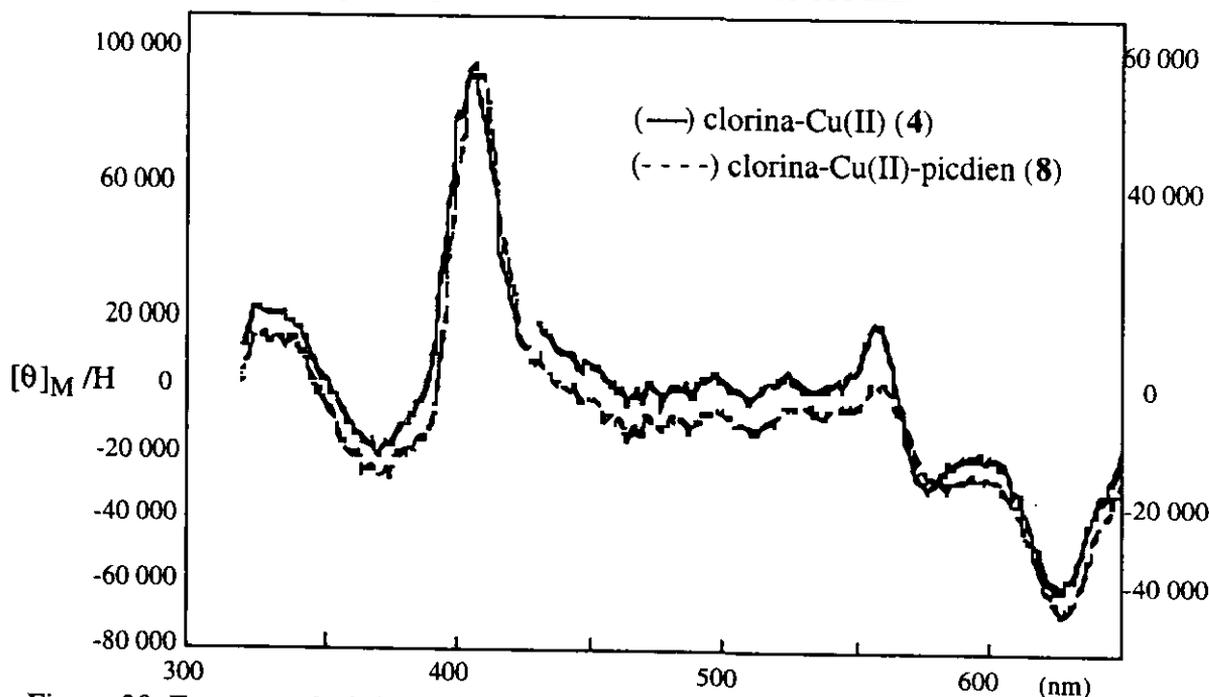


Figura 30. Espectros de DCM del complejo clorina-Cu(II)-picdien **8** y de su precursor **4** que se estudiaron en este trabajo.

En la Tabla 17 se presentan las longitudes de onda y las amplitudes de las bandas de DCM que presentan los complejos de clorina-Cu(II)-picdien **8** y del complejo sin picdien **4** inicial, que se estudiaron como parte de los complejos porfirina-pinza, objeto de estudio de este trabajo. Los datos reportados para los espectros de DCM de los complejos porfirina-pinza con Cu(II) son muy cercanos a los de UV-Vis, así como la forma de línea de los espectros. Cuando se comparan los espectros de DCM de las porfirinas de Cu(II) con la primera derivada de los espectros de UV-Vis (Figura 31) de las mismas, no tienen ninguna

Tabla 17. Datos de la espectroscopia de DCM para los complejos clorina-Cu(II) **4** y clorina-Cu(II)-picdien **8**. Características espectroscópicas de las bandas de asoret para cada complejo.

Complejo	$\lambda$ Soret	$[\theta]_M$ Soret	A Soret	$\lambda$ Soret	$[\theta]_M$ Soret	A Soret
clorina-Cu(II) <b>4</b>	369.23-403.84	-22 400.0	76 800.0	369.23-403.84	-22 400.0	76 800.00
		+99 200.0			+99 200.0	
clorina-Cu(II)-picdien <b>8</b>	375.00-407.69	-28 800.0	70 400.0	375.00-407.69	-28 800.0	70 400.00
		+99 200.0			+99 200.0	

$[\lambda] = [\text{nm}]$ ;  $[\theta]_M = [\text{grados dmol}^{-1} \text{cm}^2]$ ;  $[A] = [\text{grados dmol}^{-1} \text{cm}^2]$

Bandas Q de los espectros de DCM de los complejos clorina-Cu(II) **4** y clorina Cu(II)-picdien **8**.

Complejo	$\lambda_1$	Q (I)	A 1	$\lambda_2$	Q (II)	A 2	$\lambda_3$	Q (III)	A 3	$\lambda_4$	Q (IV)
		$[\theta]_M 1$			$[\theta]_M 2$			$[\theta]_M 3$			$[\theta]_M 4$
clorina-Cu(II) <b>4</b>	496.15	+2 800.0	5 800.00	521.43	-3 466.67	3 466.67	555.76	+13 000.0	32 200.0	596.14	-12 000.0
	509.61	-8 000.0		536.00	0.00		574.98	-19 200.0		621.14	-37 500.0
clorina-Cu(II)-picdien <b>8</b>	499.99	-4 000.0	4 000.00	531.43	-3 333.33	1 600.00	555.76	+1 000.0	30 900.0	596.14	-11 500.0
	509.61	-8 000.0		536.00	-4 933.33		581.72	-29 900.0		626.91	-44 000.0

similitud. En cambio si son muy semejantes a los espectros de UV-Vis de las porfirinas-Cu(II). Esto permite proponer que los espectros de DCM de los dos compuestos de clorina-Cu(II) son esencialmente del tipo B, con la banda  $Q_4$  de signo negativo.

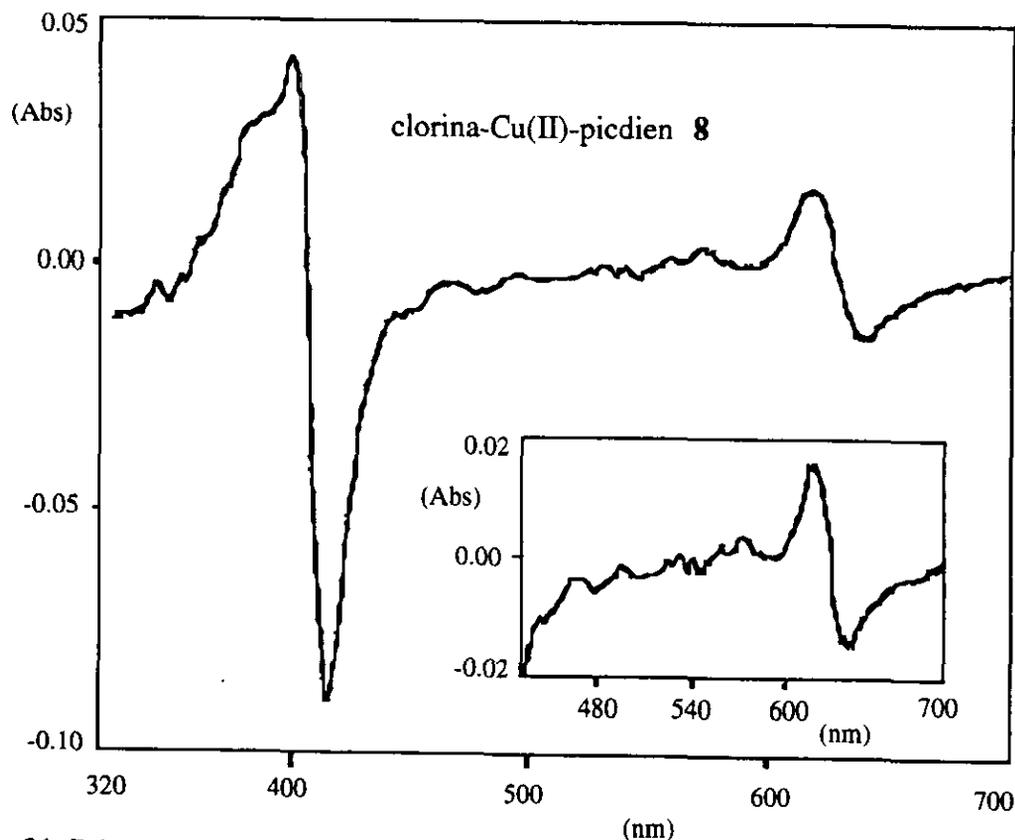


Figura 31. Primera derivada del espectro de UV-Vis del complejo clorina-Cu(II)-picdien 8.

La propuesta de un espectro de DCM tipo B para la clorina-Cu(II)-picdien y su complejo precursor, indica estados no degenerados que son perturbados débilmente por el campo magnético externo y con transiciones únicas. El comportamiento de las bandas  $Q$  del complejo con ligante picdien es muy semejante al de UV-Vis en cuanto a que su intensidad disminuye y se vuelven más anchas por una disminución de la probabilidad de la transición. Ambos espectros son típicos de porfirina-Cu(II).

### II. 4. 3 Resonancia magnética nuclear de protón.

Los espectros de RMN de protón de los complejos clorina-Cu(II) **4** y clorina-Cu(II)-picdien **8** se muestran en la Figura 32. El espectro del complejo **4** tiene muy baja resolución y no pudo mejorarse. Muestra un grupo de señales de una intensidad muy baja en 8.8-8.58 ppm correspondiente a los protones meso.

En 5.1-6 ppm se observan un conjunto de señales correspondientes a los protones del 2-vinilo y en 3.1-3.6 ppm se observan tres señales de los metilos-hemo y del metilo del grupo 4-etilo. En el intervalo 1.2-1.6 ppm un grupo de señales de los protones azaciclo-1,2-penteno y a los protones de los grupos 2-propionato, 4-etilo y 20-acetato.

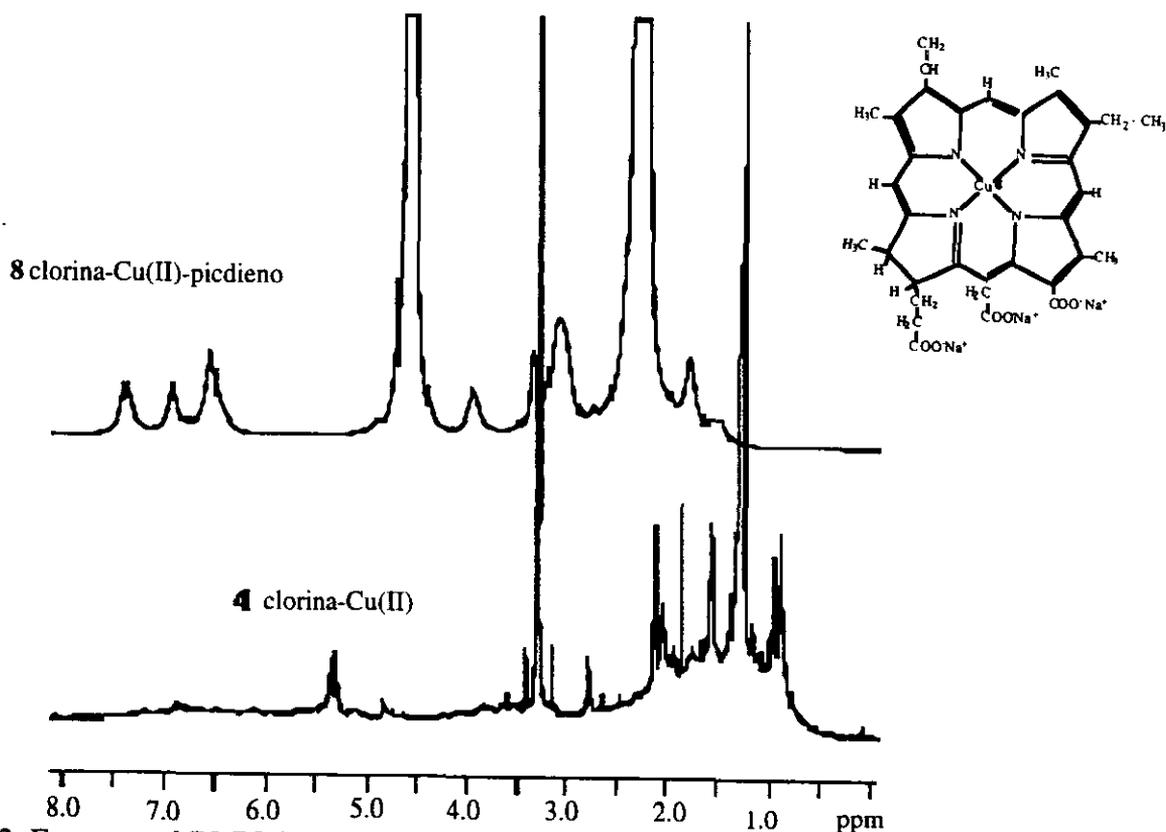


Figura 32. Espectros d RMN de protón de 500 MHz de los complejos clorina-Cu(II) **4** y clorina-Cu(II)-picdien **8**

Para el compuesto **8** el espectro de RMN de protón muestra señales en las mismas frecuencias que su materia prima aunque mucho más anchas. Además, en el intervalo 6.5-7.4 ppm aparecen tres señales de los protones piridílicos del ligante picdien (para el picdien sólo el

espectro de RMN de protón muestra éstas mismas señales en el rango de 7.5-8.6 ppm). El ancho de línea de las señales del compuesto **8** indica que el tiempo de relajación nuclear disminuye, cosa que es consistente con el aumento de la eficiencia y/o el número de rutas de relajación, además de la nueva dinámica que el sistema ha adquirido con el ligante axial. La naturaleza paramagnética del Cu(II) en estos complejos obstaculiza el análisis más detallado de estos espectros de RMN de protón.

## II. 4. 4. Resonancia Paramagnética

*Electrónica.* Los espectros de RPE de los complejos de clorina-Cu(II) **4** y clorina-Cu(II)-picdien **8** que se hicieron en soluciones como vidrios congelados, así como las simulaciones computacionales se muestran en la Figura 33.

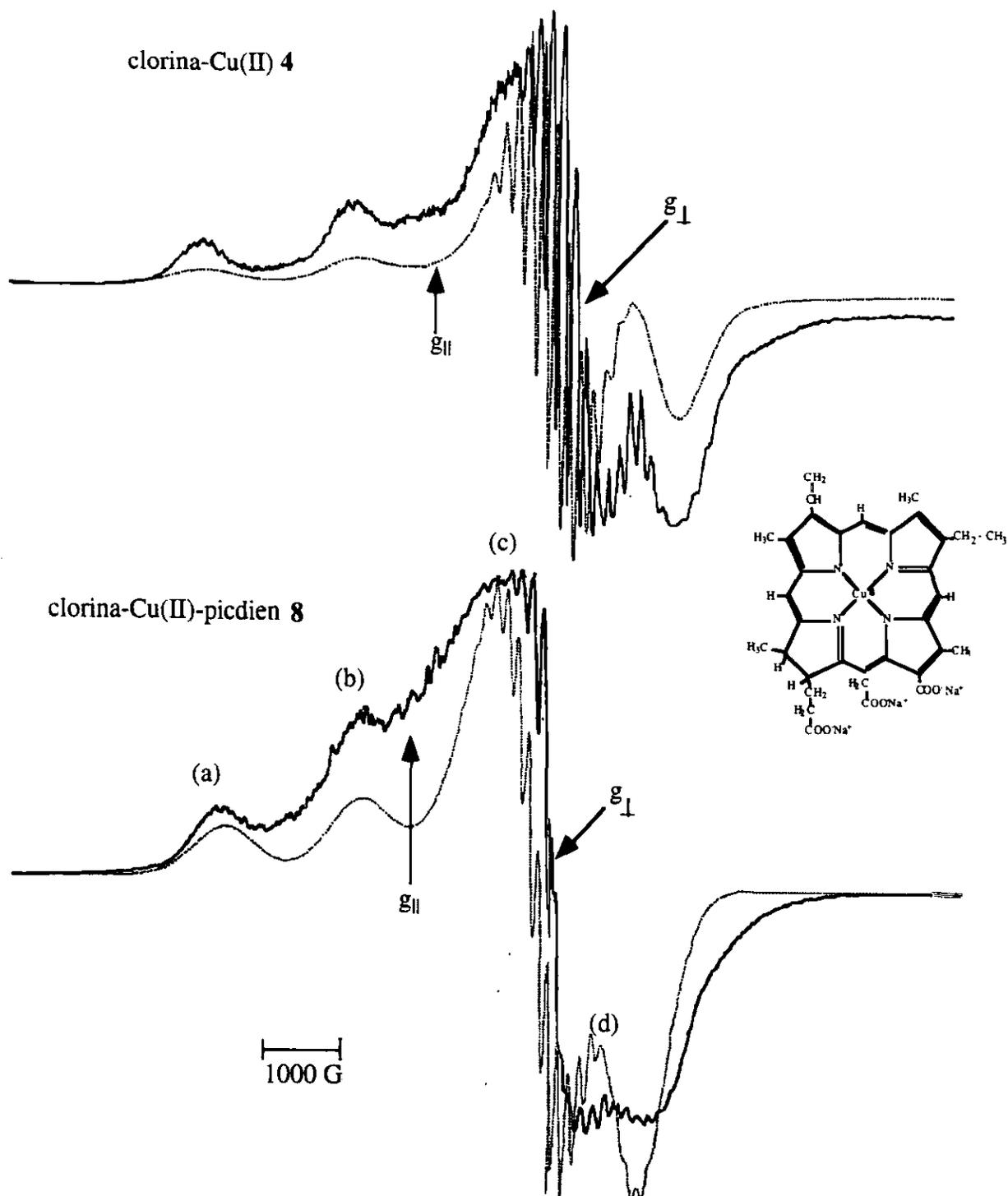


Figura 33. Espectros de RPE ( — ) y sus simulaciones ( ... ) de los complejos clorina-Cu(II) **4** (arriba) y clorina-Cu(II)-picdien **8** (abajo).

Ambos espectros son cercanamente axiales con una pequeña rombicidad mostrando claramente el acoplamiento hiperfino y la interacción superhiperfina (*shfc*) asignada a los núcleos de los nitrógenos coordinados axialmente al Cu(II) en las posiciones quinta y sexta del plano de la clorina. Esta clase de espectros han sido reportados previamente para compuestos relacionados con **4** y **8**.<sup>62,121</sup>

II. 4. 4 Simulación de espectros y cálculo de parámetros de orbitales moleculares. La Tabla 18 resume los parámetros óptimos después de haber realizado numerosas simulaciones con el programa "Program Pow".<sup>122</sup> Se hace hincapié en que la mejor simulación del espectro de RPE del complejo **8** se pudo lograr solamente cuando fueron incluidos más de cuatro nitrógenos en el *shfc*. Las simulaciones de los espectros de EPR se hicieron en la Escuela Superior de Física y Matemáticas de IPN como parte del trabajo de investigación que realiza el equipo del Dr. Zamorano.<sup>123</sup>

Algunas diferencias surgen cuando se analizan los espectros. El grupo de líneas del *shfc* (c) y (d) en la región perpendicular del complejo **8** son 63% más anchas que las líneas correspondientes en el compuesto **4**. El proceso de simulación fue muy sensible en este intervalo solamente en el parámetro del ancho de línea y no en otro. Este hecho indica que si se toman diferentes anchuras del mismo tamaño para cada compuesto, entonces los tiempos de relajación del electrón desapareado en el compuesto **8** son más pequeños que en el compuesto **4** debido a una mayor eficiencia y una mayor *shfc* de los nitrógenos más numerosos.

Esta anchura de las líneas del *shfc* es consistente con la anchura de línea del espectro de RMN de protón, antes mostrado, indicando ambos una apreciable interacción de la envoltura magnética y electrónica del ligante picdien en el complejo **8**.

Numerosas simulaciones de ambos espectros permitieron establecer que la altura relativa (d) característica del espectro está relacionada con el número de átomos de nitrógeno considerado en el *shfc*. El espacio relativo entre las líneas del *shfc* en la parte perpendicular del

Table 18. Parámetros de los espectros de UV-Vis y EPR de los complejos de Cu(II) **4** y **8** tomados en soluciones dispersadas homogéneamente en vidrios.

Complejo	$\xi_{\parallel}$ cm <sup>-1</sup>	$\xi_{\perp}$ cm <sup>-1</sup>	$A_{\parallel} \cdot 10^{-4}$ cm <sup>-1</sup>	$A_{\perp} \cdot 10^{-4}$ cm <sup>-1</sup>	$\xi_0$ cm <sup>-1</sup>	$A_0 \cdot 10^{-4}$	$\Gamma_{\parallel} \cdot 10^{-4}$	$\Gamma_{\perp} \cdot 10^{-4}$	Bands $\bar{\nu}$ , cm <sup>-1</sup>
<sup>a</sup> clorina-Cu(II)	<b>4</b> 2.185	2.056	200.00	21.00 18.50	2.09	80	35.00	3.75	20 584 18 587 17 241 15 954
<sup>a</sup> clorina-Cu(II)-picdien	<b>8</b> 2.170	2.046	210.00	21.00 18.50	2.08	83	50.00	10.00	21 505 18 089 17 152 15 903
<sup>b</sup> protoporfirina-Cu(II) IX	2.18	2.09	205.00	28.0					
<sup>b</sup> tetrafeniporfirina-Cu(II)	2.20	2.05	201.50	30.00				25 800	
<sup>b</sup> hematoporfirina-Cu(II)	2.20	2.08	214.00	47.60				24 900	
<sup>c</sup> tropolonate-Cu(II) (I)	2.253	2.043	178.10	27.30			36.40	2.20	62 001 17 508 14 699
<sup>d</sup> <i>pseudomona aeruginosa</i> tipo 2 (mutante His117Gly)	2.234	2.058	156.00					25 000	15 773

<sup>a</sup>Datos de este trabajo, <sup>b</sup>Nonomura *et al*,<sup>62</sup> <sup>c</sup>Antosik *et al*,<sup>24</sup> y <sup>d</sup>Blaauwen *et al*,<sup>66</sup>.

espectro de EPR para el compuesto **8**, define dos subgrupos de líneas de *shfc*. Este hecho refleja que los seis átomos de nitrógeno involucrados no son equivalentes y por ello el grupo puntual de simetría debe ser más baja que  $D_{4h}$ . En efecto, la mejor simulación de los dos espectros de EPR tuvieron que ser rómbicos. Variando algún parámetro de las simulaciones de EPR  $\leq 10\%$ , a excepción de los valores de  $g$  que permitieron una variación  $< 4\%$ , no se modifica significativamente la mejor simulación. Este análisis de EPR indica que el grupo puntual de simetría de cada complejo debe ser  $D_{2h}$  o  $C_{2h}$  o  $D_2$ .

Los parámetros  $g_{\parallel}/A_{\parallel}$  se han utilizado ampliamente como una medida de la distorsión del anillo clorínico.<sup>60</sup> Este parámetro toma el valor 109.2 para el complejo **4** y de 108 para el **8**. Ambos números son lejanos al valor esperado (200) para compuestos tetracoordinados pero son cercanos a los reportados para complejos de Cu(II) hexacoordinados.<sup>62,119</sup>

De acuerdo a la discusión anterior, las funciones de onda de los orbitales antienlazantes obtenidos de la combinación de los orbitales  $3d$  del cobre y las funciones de onda de los ligantes, para la simetría  $D_{2h}$  son:<sup>125</sup>

$$\Psi_{B_{1g}} = \alpha d_{xy} - 1/2 \alpha' [ -\sigma_{xy}^{(1)} + \sigma_{xy}^{(2)} + \sigma_{xy}^{(3)} - \sigma_{xy}^{(4)} ] \quad (8)$$

$$\Psi_{A_g} = \beta d_{x^2 - y^2} - 1/2 (1 - \beta^2)^{1/2} [ -p_{xy}^{(1)} - p_{xy}^{(2)} + p_{xy}^{(3)} + p_{xy}^{(4)} ] \quad (9)$$

$$\Psi_{A_{1g}} = \gamma d_{3z^2 - r^2} - 1/2(1-\gamma^2)^{1/2} [ \sigma_{xy}^{(1)} + \sigma_{xy}^{(2)} - \sigma_{xy}^{(3)} - \sigma_{xy}^{(4)} ] \quad (10)$$

$$\Psi_{B_{3g}} = \delta' d_{yz} - 1/2 (1 - \delta'^2)^{1/2} [ p_z^{(1)} + p_z^{(2)} - p_z^{(3)} - p_z^{(4)} ] \quad (11)$$

$$\Psi_{B_{2g}} = \delta'' d_{xz} - 1/2 (1 - \delta''^2)^{1/2} [ p_z^{(1)} + p_z^{(4)} - p_z^{(2)} - p_z^{(3)} ] \quad (12)$$

Para esta simetría, los modelos teóricos<sup>125,126</sup> proponen como estado base al orbital molecular  $\Psi_{B_{1g}}$ . De acuerdo a las bandas  $Q$  del UV-Vis de cada compuesto, la energía de los orbitales moleculares  $\Psi_{A_g}$ ,  $\Psi_{A_{1g}}$ ,  $\Psi_{B_{3g}}$  y el orbital molecular más alto  $\Psi_{B_{2g}}$  están ubicados en  $15\,900\text{ cm}^{-1}$ ,  $17\,000\text{ cm}^{-1}$ ,  $18\,000\text{--}19\,000\text{ cm}^{-1}$  and  $20\,000\text{--}21\,000\text{ cm}^{-1}$  respectivamente.

La relación entre los parámetros espectroscópicos del UV-Vis y del EPR está dada por la teoría de campo ligante aplicada a las funciones de onda de orbitales moleculares en las

ecuaciones (16-20).<sup>62,66,67,125</sup> Utilizando el procedimiento de Nonomura *et al.*,<sup>62</sup> Blaauwen *et al.*,<sup>66</sup> Antosik *et al.*,<sup>124</sup> Gersmann *et al.*,<sup>62,125</sup> y otros,<sup>67,121,126</sup> los parámetros del hamiltoniano de espín, diferencias en la energía electrónica y los coeficientes de los orbitales enlazantes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  para un sistema  $D_{2h}$  están relacionados con el siguiente grupo de ecuaciones:

$$g_z = g_e - (8\lambda/\Delta_x^2 - y^2) [\alpha^2\beta^2 - f(\beta)] \quad (13)$$

$$f(\beta) = \alpha\alpha'\beta S + \alpha\alpha'\beta(1-\beta^2)^{1/2}T(n)/2 \quad (14)$$

donde  $T(n) = 0.333$

$$g_x = g_e + (2\lambda/\Delta_{xz})[\alpha^2\delta'^2 - \alpha\alpha'\delta'\delta'^2] \quad (15)$$

donde  $S = 0.093$

$$g_y = g_e - (2\lambda/\Delta_{yz})[\alpha^2\delta'^2 - \alpha\alpha'S\delta'^2] \quad (16)$$

$$A_z = P \{ -\alpha^2(4/7 + K) - [(2\lambda\alpha)(4\beta/\Delta_x^2 - y^2) + (3/14)(\delta'^2/\Delta_{yz}) + (3/14)(1/\Delta_{xz})] \} \quad (17)$$

$$A_x = P [\alpha^2(2/7 - K) - (22/14)(\lambda\alpha^2\delta'^2/\Delta_{xz})] \quad (18)$$

$$A_y = P [\alpha^2(2/7 - K) - (22/14)(\lambda\alpha^2\delta'^2/\Delta_{yz})] \quad (19)$$

$$\alpha^2 + \alpha'^2 \neq 2\alpha\alpha'S = 1 \quad (20)$$

Donde cada símbolo tiene su significado habitual. La constante de acoplamiento espín-órbita para el ion libre Cu tiene el valor  $830 \text{ cm}^{-1}$ .<sup>122,123</sup> La contribución dipolar al parámetro isotrópico de acoplamiento hiperfino  $P$  ha sido calculado como  $0.0354 \text{ cm}^{-1}$ ;  $T(n)$  y  $S$  son las integrales moleculares evaluadas para Cu-N como 0.0333 and 0.093 respectivamente.<sup>119,125,126</sup>

En este trabajo los coeficientes de enlace de algunos orbitales moleculares y el valor de  $K$  (el parámetro de corrección al término de contacto de Fermi) fueron calculados por los parámetros determinados experimentalmente  $g_x$ ,  $g_y$ ,  $g_z$ ,  $A_x^{Cu}$ ,  $A_y^{Cu}$ ,  $A_z^{Cu}$ ,  $A_{\parallel}^N$ ,  $A_{\perp}^N$  utilizando las ecuaciones (13-20) y la evaluación de  $\alpha^2$  se llevó a cabo con las ecuaciones (17-

20). Para estas evaluaciones numéricas, se utilizó la aproximación de  $g_x \approx g_y$ . Los resultados se reportan en la Tabla 19.

El valor del coeficiente  $\alpha$  es más bajo para **8** comparado con el valor del parámetro de **4** y de acuerdo al valor del parámetro molecular  $\alpha'$  que es más grande para el compuesto **8**, indicando un aumento en la participación del electrón desapareado del ion Cu(II) en **8** en el enlace con alguno de los átomos de nitrógeno de la esfera de coordinación.

Tabla 19. Energía de campo ligante y parámetros de los complejos clorina-Cu(II)-picdien **8** y su precursor clorina Cu(II) **4**.

Compuesto	$\alpha$	$\alpha^2$	$\alpha'$	$\alpha'^2$	$\beta$	$\beta^2$	$\delta'$	$\delta'^2$	$\delta''$	$\delta''^2$	$K$	Sim.
<sup>a</sup> Clorina-Cu(II) <b>4</b>	0.88	0.78	0.56	0.31	0.77	0.59	0.75	0.56	1.73	3	0.41	$D_{2h}$
<sup>a</sup> Clorina-Cu(II)- picdien <b>8</b>	0.81	0.66	0.66	0.44	0.76	0.57	0.98	0.96	1.88	3.53	0.47	$D_{2h}$
<sup>b</sup> tetrafenilpor- firina-Cu(II)	0.88	0.78										$D_{4h}$
<sup>c</sup> Cu-HP	0.86	0.66										$D_{4h}$
<sup>d</sup> CuCl-(piridina)	0.87	0.76	0.7	0.49	0.93	0.86	0.73	0.53				$D_{2h}$
<sup>e</sup> Cu(II)-bis- salicilaldoxima	0.87	0.76	0.76	0.32	0.89	0.79	0.88	0.77				$D_{2h}$
trópolisonato- Cu(II) (I)	0.93	0.87			0.97	0.94						$D_{4h}$
<sup>b</sup> tetrafenilpor- firina-Cu(II)					~ 1							$D_{2h}$

<sup>a</sup>Datos de este trabajo, <sup>b</sup>Nonomura *et al.*,<sup>62</sup> <sup>c</sup>Gersmann *et al.*,<sup>125</sup> <sup>d</sup>Antosik *et al.*,<sup>124</sup> <sup>e</sup>Kuska *et al.*<sup>126</sup>

Los valores de  $\alpha$  y  $\alpha'$  para los compuestos **4** y **8** muestran que la densidad del electrón desapareado está desplazada hacia los orbitales de los ligantes nitrógenos más extensamente en el compuesto **8** con el ligante picdien que en el compuesto inicial **4**, los enlaces Cu-N adquieren más carácter covalente en el compuesto con picdien que en el

precursor sin él, debido a la presencia de los nitrógeno de los piridilos coordinados, mientras la distorsión del plano del anillo clorínico ha permanecido casi igual en ambos compuestos.

El coeficiente  $\beta$  es el mismo para ambos compuestos indicando una deslocalización electrónica similar en los orbitales  $d_{x^2-y^2}$  y el  $\pi p_{xy}$  del plano distorsionado de la clorina.

Los coeficientes  $\delta'$  y  $\delta''$  en el compuesto **8** son muy cercanos a la unidad, significando que los orbitales moleculares  $\psi_{B_{3g}}$  y  $\psi_{B_{2g}}$  son los orbitales del metal  $d_{yz}$  y  $d_{xz}$  respectivamente. Sin embargo, los orbitales del metal no participan en la deslocalización de la densidad de espín. Como estos orbitales se combinan con los respectivos orbitales  $\pi p_z$  y  $\pi p_{xz}$  del ligante clorínico, entonces existe un nodo en el sitio del Cu(II) dentro del macrociclo y no en su sistema  $\pi$ .<sup>125</sup>

En contraste, los coeficientes  $\delta'$  y  $\delta''$  para el compuesto inicial **4** son apreciablemente menores que la unidad, significando que en este compuesto existe más participación de la densidad electrónica entre los orbitales moleculares  $\psi_{B_{3g}}$  and  $\psi_{B_{2g}}$ .

II. 4. 5. Diagramas de energía.

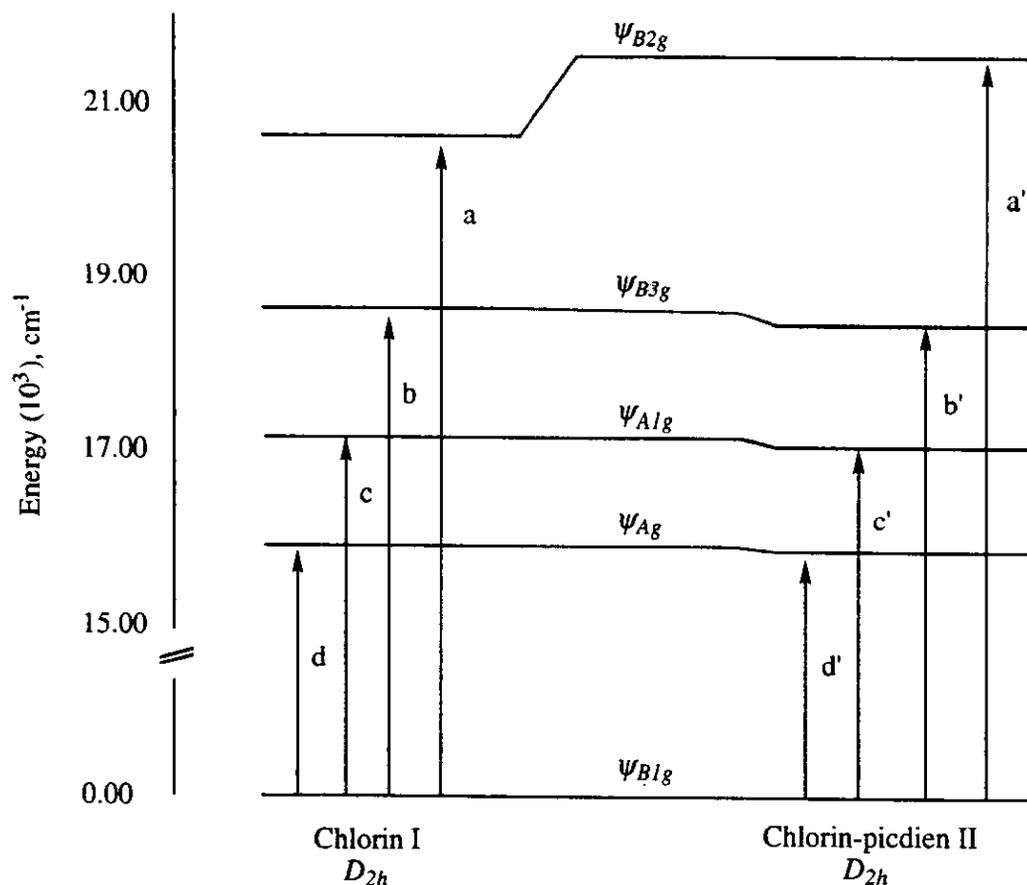


Figura 34. Diagrama de los niveles de energía de los orbitales moleculares para los complejos clorina-Cu(II) **4** y clorina-Cu(II)-picdien, estudiados en esta investigación.

El diagrama de los niveles de energía electrónicos, el orden de los orbitales moleculares, las diferencias de energía de los electrones se obtuvieron de los espectros de UV-Vis, los coeficientes de los orbitales moleculares y el grupo puntual de simetría, para cada compuesto, es mostrado en la Figura 34.

Una diferencia cuantitativa de los niveles de energía entre los dos diagramas es evidente, aunque el orden de los orbitales moleculares es el mismo para ambos compuestos. En particular, el nivel de energía superior para el **8** es más alto en energía con respecto al mismo nivel del complejo **4**. Las transiciones marcadas con  $a$  y  $a'$  corresponden a las bandas en  $20\,585 \text{ cm}^{-1}$  y  $21\,505 \text{ cm}^{-1}$  de los complejos **4** y **8**, respectivamente. Similarmente las transiciones  $b$  y  $b'$ ,  $c$  y  $c'$ ,  $d$  y  $d'$  están asignadas a las bandas  $18\,587$ ,  $18\,089 \text{ cm}^{-1}$ ,  $17\,241$ ,

17 152  $\text{cm}^{-1}$  y 15 954, 15 903  $\text{cm}^{-1}$ .

Los parámetros medidos de los espectros de UV-Vis y EPR, los coeficientes de los orbitales moleculares obtenidos de ellos por medio de la teoría de campo ligante y los diagramas de energía de la Figura 34 muestran dos complejos de clorina-Cu(II) hexacoordinados con ligantes nitrógenos (mínimo seis) y con una fuerte distorsión octaédrica con el mismo grupo puntual de simetría  $D_{2h}$ .

En estos dos complejo de Cu(II) parece que la distorsión geométrica y los efectos de la configuración electrónica pudieron separarse, permaneciendo igual cuando el ligante coordinado axialmente cambió. Esto indica una estabilidad relativa de la estructura del anillo clorínico con respecto a la coordinación del ligante axial.

## II.5 CONCLUSIONES DE LOS ESTUDIOS ESPECTROSCÓPICOS DE LOS COMPLEJOS PORFIRINAS-Fe(III)-PICDIEN Y CLORINA-Cu(II)-PICDIEN

### II.5.1 Estructura propuesta para los nuevos complejos reportados.

Los estudios espectroscópicos de UV-Vis, DCM, RMN de  $^1\text{H}$  y RPE que se realizaron con los nuevos complejos que se reportan en este trabajo, porfirinas-Fe(III)-picdien **5-7** y clorina-Cu(II)-picdien **8**, indican que los cuatro complejos son hexacoordinados con ligantes nitrógeno (cuatro en el plano de la porfirina y clorina y dos axiales provenientes de los piridilos del picdien). Estos ligantes conforman una geometría octaédrica distorsionada alrededor del ion metálico, y de acuerdo con el comportamiento en UV-Vis y DCM, con un grupo puntual  $\sim D_{4h}$  para las de porfirinas-Fe(III) y menor o igual a  $D_{2h}$  para la de Cu(II).

La espectroscopía de RMN de protón muestra para las porfirinas-Fe(III)-picdien **5-7** que son hexacoordinadas, y que el ligante axial propicia un estado de espín mezclado cuánticamente para el hierro(III). Esto es confirmado por los estudios espectroscópicos de RPE de los cuales se pudieron obtener los porcentajes de mezcla cuántica del estado espín  $5/2$  dentro del  $3/2$ , confirmando una pureza más alta pureza del  $3/2$  en una de las especies y en el orden  $5 > 6 > 7$ .

Para el complejo de clorina-Cu(II) los estudios de UV-Vis y RPE, permitieron determinar que la presencia del ligante axial picdien propicia el reordenamiento de los OM con una estructura electrónica diferente a la de su precursor, al mismo tiempo que se cuantificaron los coeficientes de los OM. La información de esos resultados indicó que la covalencia aumentó cuando el ligante axial se coordinó en el Cu(II). También se cuantificó una variación muy pequeña de la distorsión del plano de la clorina cuando el picdien se coordinó axialmente.

Con base en lo anteriormente expuesto, la estructura que se propone para los compuestos que se reportan en este trabajo corresponde a la mostrada en la Figura 35.

El modelo que se obtuvo en esta investigación no ha sido reportado dentro del grupo de compuestos modelo de metaloproteínas encontrados en la literatura científica, y por tal motivo le hemos denominado familia de porfirinas-pinza.

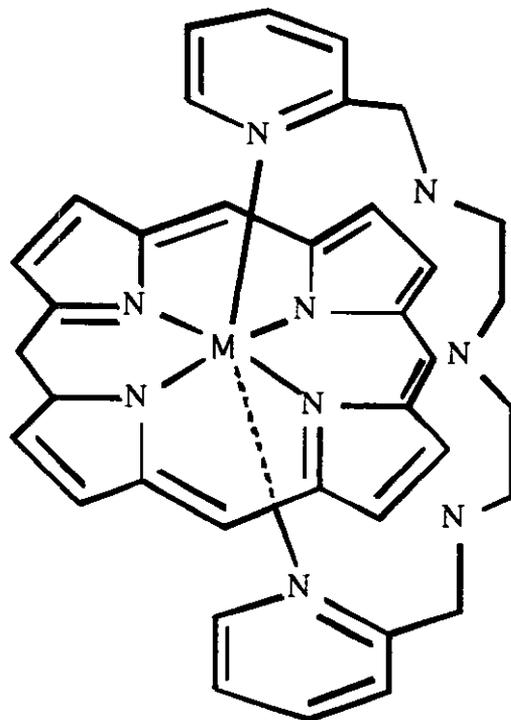


Figura 1. Propuesta de la estructura de la familia de *porfirinas-pinza*. No se pusieron los sustituyentes de la porfirina debido a la intención de tener mayor claridad en la ilustración. M representa al metal que ocupa el centro de la porfirina.

## CAPITULO III

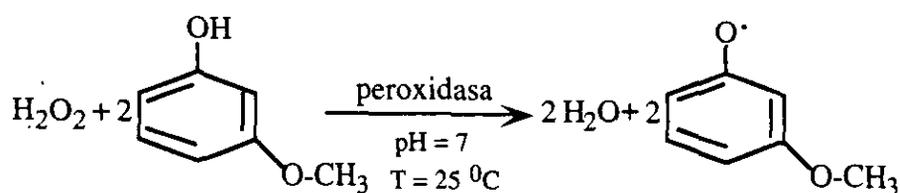
### PRUEBAS DE ACTIVIDAD CATALÍTICA COMO PEROXIDASA DE LOS COMPLEJOS OBTENIDOS

### III.1 Antecedentes

Una de las características de las enzimas peroxidasa es la especificidad de su sustrato aceptor de hidrógeno (oxidante), que solamente pueden ser peróxido de hidrógeno, de metilo y de etilo. En cambio, la enzima no tiene especificidad por el agente donador de hidrógeno (reductor). Una lista con más de quince reductores incluye, entre otros, guayacol, hidroquinona, catecol, resorcinol, pirogalol, anilina y m-fenilendiamina, todos ellos compuestos aromáticos.<sup>127</sup>

Las peroxidasa pueden detectarse si a la muestra se le hace un ensayo de actividad en el que espectrofotométricamente se observa o mide la disminución de la concentración del peróxido o del reductor, o bien la formación del o los productos de oxidación.

Algunos métodos que dan resultados muy exactos son los que utilizan o-dianisidina, o-fenilendiamina y mesidina como sustratos reductores; sin embargo, este uso es muy limitado porque sus productos de oxidación tienen actividad carcinogénica. El método para el ensayo de actividad como peroxidasa más antiguo y más utilizado es el del guayacol. Las condiciones en que la cinética de la reacción se realice determinarán los productos de oxidación y por lo tanto las longitudes de onda con las que se mida la velocidad de la reacción. Bajo las mejores condiciones de reacción la reacción estequiométrica procede muy rápido y una mol de peróxido de hidrógeno oxida una mol de guayacol. La ecuación de la reacción total es:<sup>127</sup>



Reactivos	Vol. celda	Conc. final
Buffer de fosfato 0.1M; pH 7.0	3.00 ml	0.1 M
Solución acuosa de guayacol 20.1M	0.05 ml	0.316mM
Solución acuosa de peróxido de hidrógeno 12.3mM	0.03 ml	0.116mM
Enzima (muestra)		

Bajo ciertas condiciones de reacción la estequiometría que guarda la reacción es de un mol de peróxido para oxidar un mol de guayacol; el producto final es guayacol deshidrogenado (POG) que absorbe radiación de una longitud de onda de 436 nm. La transición tiene un coeficiente de extinción molar de  $6,390 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . Se pueden conseguir condiciones de reacción en las cuales la velocidad no dependa de la concentración del donador.<sup>127</sup>

La coloración que aparece cuando se hace la mezcla de reacción varía del naranja tenue al naranja oscuro dependiendo de que tan alta sea la actividad (a mayor actividad mayor intensidad y oscurecimiento de la solución) y la duración de esa coloración es de diez minutos. Por lo tanto se recomienda que el tiempo de reacción no sea mayor de cinco minutos.<sup>127</sup>

Los modelos cinéticos de peroxidasas que se han reportado son complejos que contienen metalopofirinas como núcleo básico de su estructura a las que se adicionan sustituyentes axiales, éstos, conjuntamente con los del macroligante, determinan su funcionalidad como catalizadores de reacciones de oxidación de sustratos donadores de hidrógeno utilizando como agentes oxidantes diferentes tipos de peróxidos.

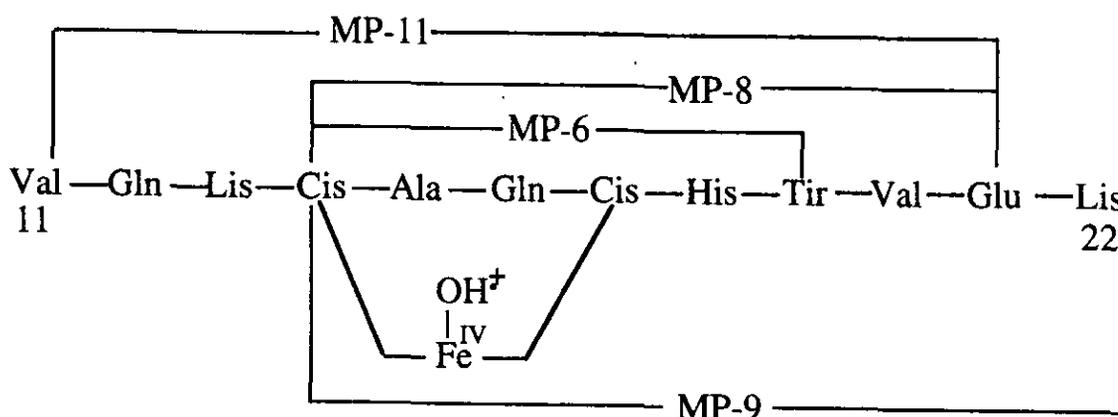


Figura 35. Secuencia de aminoácidos de los cuatro hemo-péptidos MP 6, 8, 9 y 11 más comunes. Se obtienen por la digestión de *citocromo c* de equino con varias enzimas proteolíticas. La numeración de los aminoácidos se refiere a la posición en la secuencia primaria en el *citocromo c*.<sup>128</sup>

Otros modelos utilizados contienen en su estructura algunos aminoácidos unidos al hierro-hemo, característicos de algunas peroxidasas con estructuras resueltas por difracción de rayos-X como microperoxidasas-N (MP-N), donde N es el número de residuos de aminoácidos que se conservan en la estructura) (Figura 35).

El grupo de Kelly<sup>129</sup> ha realizado investigaciones sobre la reactividad de algunas porfirinas-hierro(III) como análogos de peroxidasas y ha obtenido información muy interesante sobre su capacidad catalítica y su estabilidad frente a peróxidos. Encontraron que la ferrideuteroporfirina tiene una menor dimerización (formación de complejos  $\mu$ -oxo o  $\mu$ -peroxo) que la protoporfirina y la mesoporfirina (Figura 1, pág. 6).

Los complejos que se han reportado como modelos cinéticos de peroxidasas se han estudiado en disolventes orgánicos o en mezclas de ellos con agua.<sup>57</sup> Uno de los problemas severos que se tienen con este tipo de complejos es su baja solubilidad en disolventes polares que por otro lado facilitan su coordinación con el metal central y su oxidación irreversible.<sup>42,54</sup> Los estudios de las peroxidasas con compuestos modelo se han encaminado principalmente a resolver tres preguntas fundamentales: 1) ¿cómo es el intermediario de alto estado de oxidación formado en el proceso catalítico?; 2) ¿cuál es su estructura?; 3) ¿cuál es el mecanismo de su reacción con sustratos?. Las respuestas a esas tres preguntas están parcialmente dadas; sin embargo no se ha podido caracterizar espectroscópicamente de una manera definitiva los intermediarios propuestos (Compuestos I y II). Tampoco se ha podido comprobar la estructura de alguno de los intermediarios ya que no se han podido aislar. Se siguen haciendo estudios cinéticos variando condiciones para comprender con más claridad el mecanismo de reacción con diferentes sustratos. Un aspecto muy interesante e importante es la aplicación de los modelos cinéticos como catalizadores de reacciones de oxidación de diferentes materias primas, con el fin de obtener procesos químicos de alta especificidad con excelentes rendimientos y en condiciones

relativamente suaves.<sup>59</sup> Algunos de estos compuestos modelo se han empleado industrialmente para catalizar reacciones de epoxidación,<sup>19-23</sup> hidroxilación<sup>130-132</sup> y fotodescarboxilación.<sup>133</sup>

En la Tabla 20 se reportan datos del comportamiento cinético de la peroxidasa de rábano blanco (HRP) y de algunos complejos de porfirinas-hierro(III) que presentaron esa actividad. Puede observarse que los valores de las constantes de segundo orden para la enzima depende de las condiciones de reacción.

Tabla 20. Datos del comportamiento cinético de *peroxidasa de horseradish* y complejos de hierroporfirinas reportados como modelos de peroxidasas

Compuesto [concl. M]	pH	Disolvente	T °C	[oxid]f mM	[sustrato]f mM o M	k <sub>1er. ord.</sub> s <sup>-1</sup>	k <sub>2o. ord.</sub> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	K <sub>M(A)</sub> mM	μ <sub>iónica</sub> M	Ref.
<i>peroxidasa de rábano blanco</i> 3.5x10 <sup>-7</sup>	7	agua	25	A, 7x10 <sup>-2</sup>	no	1.68x10 <sup>-1</sup>	1.8x10 <sup>7</sup>		0.11	134
<i>peroxidasa de rábano blanco</i> 0.8x10 <sup>-6</sup>	7.3	metanol 50% agua 50%	-16	A, 0.1	-	1.92x10 <sup>2</sup>	1.43x10 <sup>3</sup>	1.34x10 <sup>-1</sup>	0.1	135
<i>peroxidasa de rábano blanco</i> 0.8x10 <sup>-6</sup>	7.3	metanol 50% agua 50%	-26	A, 0.1	-	1.63x10 <sup>2</sup>	8.58x10 <sup>2</sup>	1.9x10 <sup>-1</sup>	0.1	135
<i>peroxidasa de rábano blanco</i> 0.8x10 <sup>-6</sup>	5.3	metanol 50% agua 50%	-26	A, 0.1	-	1.81x10 <sup>2</sup>	6.86x10 <sup>2</sup>	2.64x10 <sup>-1</sup>	0.1	135
tetramesitilporfirina-Fe(III)-Cl 1 equiv.		MeCl <sub>2</sub>	-46	1.2 equiv.	-	2.6x10 <sup>3</sup>	-	-	-	136
protohemina mono-3-(1'-imidazolil) propilamidamonometiléster 10 <sup>-6</sup>		metanol	25	C 10 <sup>-3</sup>	D 10 <sup>-2</sup>	-	7.6x10 <sup>3</sup>	-	-	57
protohemina mono-3-(1'-imidazolil) propilamidamonometiléster 10 <sup>-6</sup>	8.2	metanol	25	C 5x10 <sup>-4</sup>	-	-	1.4x10 <sup>5</sup>	-	0.002	*57
protoporfirina-Fe(III) 5x10 <sup>-5</sup>	7	agua	25	A, 10 <sup>-4</sup>	1.4x10 <sup>-4</sup>	3.5x10 <sup>-6</sup>	3.5x10 <sup>-6</sup>	-	0.1	137
protohemina-Fe(III) 10 <sup>-6</sup>	-	metanol	25	C 5x10 <sup>-5</sup>	D 10 <sup>-2</sup>	-	2x10 <sup>3</sup>	-	-	57
deuteroporfirina-Fe(III)-Cl 5x10 <sup>-6</sup>	7.8	metanol 20 agua 80	25	A 5x10 <sup>-6</sup>	I <sup>-</sup> 0.1 M	-	1.6x10 <sup>-4</sup>	-	0.1	137
MP-8 3-8x10 <sup>-7</sup>	7	metanol 20 agua 80	25	A, 1.4x10 <sup>-4</sup>	B, 3x10 <sup>-3</sup>	-	5.39	-	-	138

A = peróxido de hidrógeno; B = guayacol; P = pirogalol; C = ácido metacloroperbenzóico; D = triterbutilfenol; E = ácido perbenzóico; F = hidroquinona.

MP-8 = protoporfirina-Fe(III)-octapéptido de caballo (contiene los residuos 14-21 y están unidos a la hierro-porfirina vía un enlace de tioéter de cisteína-14. La His-18 está coordinada al hierro). \*Reacción catalizada con colidina.

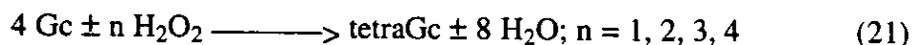
### III. 2 *Parte experimental*

III.2.1 Instrumentos, materiales y condiciones: Las mediciones cinéticas y determinaciones de concentraciones de las diferentes disoluciones que se utilizaron se hicieron en un espectrofotómetro UV-Vis-NIR Shimadzu 3100, en celdas de cuarzo de 3.5 ml con tapón de teflón hermético y con 1 cm de paso de luz, a una temperatura constante de  $25 \pm 0.1$  °C.

Todas las mediciones cinéticas se hicieron en disoluciones de metanol-agua (99:1) de los complejos de hierroporfirinas. Se utilizaron disoluciones acuosas de guayacol y de peróxido de hidrógeno (ambos de los laboratorios Aldrich).

#### III.2.2 Metodología y tratamiento de datos.

La determinación de la actividad catalítica de los complejos de "porfirinas-pinza" se hizo por el método del guayacol.<sup>127</sup> Se observó por espectroscopía de UV-Vis la reacción de oxidación del guayacol con peróxido de hidrógeno en presencia de la enzima HRP y de cada uno de los complejos que se reportan en este trabajo. Así mismo, se hicieron las pruebas de actividad utilizando mezclas de guayacol-peróxido, guayacol-complejo, guayacol, y no se observó la formación POG en las longitudes de onda en las que se presenta con los complejo 5-7. En la Figura 36 se presentan los espectros correspondientes. Las longitudes de onda a las cuales se formaron POG para cada porfirina se presentan en la Tabla 21, ecuación (21).<sup>134</sup> La velocidad máxima de la reacción se reporta en  $M^{-1} s^{-1}$  ( $mol\ l^{-1} s^{-1}$ ).



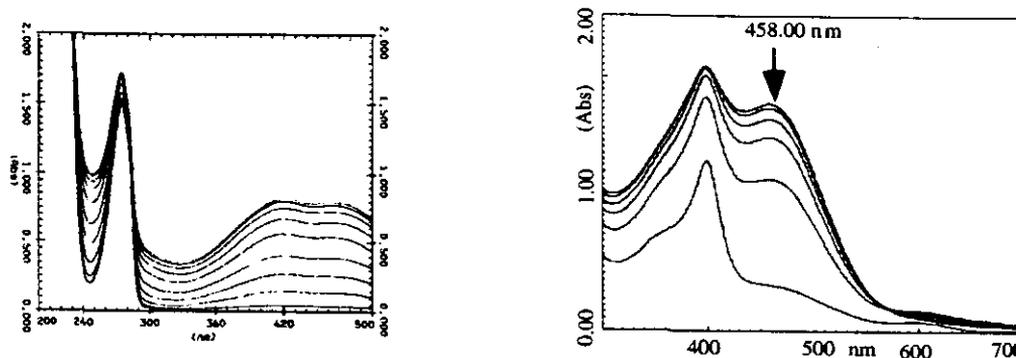
Se reporta también que los modelos de peroxidasa que se reportan en este trabajo, 5-7, son muy estables pues conservan las mismas características espectroscópicas y cinéticas durante varios meses.

Las concentraciones de las soluciones de hierroporfirinas y de peróxido de hidrógeno

Tabla 21. Longitudes de onda y pHs en las que se observa la formación de los productos de oxidación del guayacol utilizando como catalizadores los complejos de porfirina-Fe(III)-picdien y sus precursores.

Complejo	$\lambda_{POG}$	pH $\pm 0.1$
protoporfirina-Fe(III)	1 458.00	6.59
protoporfirina-Fe(III)-picdien	5 458.00	6.28
mesoporfirina-Fe(III)	2 460.80	6.89
mesoporfirina-Fe(III)-picdien	6 452.80	6.57
deuteroporfirina-Fe(III)	3 456.60	7.00
deuteroporfirina-Fe(III)-picdien	7 458.60	6.50

Actividad de la *peroxidasa de rábano blanco*      Actividad de la protoporfirina-Fe(III)-picdien 5



Actividad de la mesoporfirina-Fe(III)-picdien 6      Actividad de la deuteroporfirina-Fe(III)-picdien 7

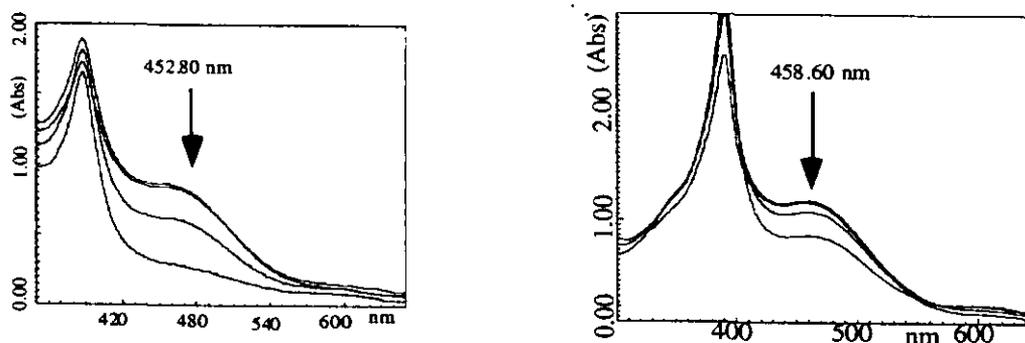


Figura 36. Espectros de UV-Vis de la reacción de guayacol con peróxido de hidrógeno en presencia de la HRP y de los complejos de protoporfirina-Fe(III)-picdien, mesoporfirina-Fe(III)-picdien y deuteroporfirina-Fe(III)-picdien. Se observa la longitud de onda a la cual se forman los POG. Las condiciones en que se obtuvieron estos espectros fueron idénticas a las utilizadas en los experimentos cinéticos que se realizaron para esta investigación.

fueron determinadas espectrofotométricamente por el Factor  $K = A/\epsilon$  ( $A$  absorbancia;  $\epsilon$  coeficiente de extinción molar) de la banda de Soret para todos los complejos. En la Tabla 22 se reportan estos datos.

Tabla 22. Factores  $K$  y longitudes de onda de las bandas de Soret de los complejos de porfirina-hierro(III) y porfirina-hierro(III)-picdien para la determinación de sus concentraciones. Se reportan también para el peróxido de hidrógeno

Compuesto	$\lambda$ (nm)	$K_1$ ( $M^{-1}cm^2$ )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	240	0.02538
protoporfirina-Fe(III)	397.4	0.008
protoporfirina-Fe(III)-picdien	399.4	0.0017
mesoporfirina-Fe(III)	377.2	0.0157
mesoporfirina-Fe(III)-picdien	388.0	0.0144
deuteroporfirina-Fe(III)	386.5	0.025
deuteroporfirina-Fe(III)-picdien	387.4	0.025

Las condiciones en que se realizaron las cinéticas se determinaron haciendo un gran número de experimentos con diferentes concentraciones de los tres reactivos de tal manera que se pudieran reproducir con más precisión los datos de velocidad inicial. Esas condiciones fueron las siguientes: temperatura,  $25 \pm 0.1^\circ C$ ; pH de  $6.2 \pm 0.01$  a  $7.00 \pm 0.01$ ; disolución acuosa de guayacol con una concentración de 20.1 mM; disolución acuosa de peróxido de hidrógeno con concentraciones de 1335-1600 mM; disoluciones de hierroporfirinas libres y sus complejos con picdien de 0.015 mM a 0.030 mM, a excepción de la protoporfirina-Fe(III)-picdien, en la que se utilizaron concentraciones máximas de 0.0069 mM debido a la imposibilidad de medir adecuadamente la velocidad inicial con concentraciones más altas. Los milimoles de cada uno de los tres reactivos en cada cinética se mantuvieron en la relación de  $5.28 \times 10^{-5}$  de hierroporfirina por  $2.4 \times 10^{-4}$  de guayacol y  $3.3 \times 10^{-2}$  de peróxido de hidrógeno, que dan como concentraciones finales para cada ensayo 0.017 mM, 0.160 mM, 11.729 mM respectivamente.

El procedimiento seguido consistió en mezclar las disoluciones de hierroporfirina, guayacol y peróxido de hidrógeno manteniendo las concentraciones constantes de dos de esas disoluciones y variando la tercera. La finalidad fue observar la dependencia de la velocidad inicial con respecto a la variación del reactivo de concentración variable. En las Tablas 23 y 24 se reportan las mediciones experimentales y su tratamiento estadístico<sup>139</sup> para la deuteroporfirina-Fe(III), como ejemplo del procesamiento de datos que se siguió con cada complejo.

Para descartar datos poco precisos se siguió el criterio de Dean y Dixon<sup>140</sup> (prueba  $Q$ ) que exige un alto grado de confiabilidad (90 por ciento) de las mediciones realizadas y que es aplicable a un número menor de diez pruebas, como en este caso. La diferencia del dato sospechoso menos el siguiente más próximo entre el rango debe permanecer menor que el valor de  $Q_{0.90} = 0.51$ .

En cuanto a los intervalos de confianza se calcularon con la fórmula (25) en la cual los valores de  $C_n$  se encuentran tabulados para varios valores de niveles de probabilidad con un número de mediciones menor de diez .

$$\mu = x_{\text{prom.}} \pm C_n R \quad (22)$$

El procedimiento seguido consistió en mezclar las disoluciones de hierroporfirina, guayacol y peróxido de hidrógeno manteniendo las concentraciones constantes de dos de esas disoluciones y variando la tercera. La finalidad fue observar la dependencia de la velocidad inicial con respecto a la variación del reactivo de concentración variable. En las Tablas 23 y 24 se reportan las mediciones experimentales y su tratamiento estadístico<sup>139</sup> para la deuteroporfirina-Fe(III), como ejemplo del procesamiento de datos que se siguió con cada complejo.

Para descartar datos poco precisos se siguió el criterio de Dean y Dixon<sup>140</sup> (prueba  $Q$ ) que exige un alto grado de confiabilidad (90 por ciento) de las mediciones realizadas y que es aplicable a un número menor de diez pruebas, como en este caso. La diferencia del dato sospechoso menos el siguiente más próximo entre el rango debe permanecer menor

que el valor de  $Q_{0.90} = 0.51$ .

En cuanto a los intervalos de confianza se calcularon con la fórmula (25) en la cual los valores de  $C_n$  se encuentran tabulados para varios valores de niveles de probabilidad con un número de mediciones menor de diez .

$$\mu = x_{prom.} \pm C_n R \quad (22)$$

Tabla 23. Datos de la variación de la concentración de peróxido de hidrógeno y de la velocidad inicial para el estudio del comportamiento cinético como peroxidasa de la deuteroporfirina-Fe(III).

Vol. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ml	Vol. total ml	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sub>f</sub> M x 10 <sup>3</sup>	V <sub>1</sub> mAbs/s	V <sub>2</sub> mAbs/s	V <sub>3</sub> mAbs/s	V <sub>4</sub> mAbs/s	V <sub>5</sub> mAbs/s	V <sub>6</sub> mAbs/s
0.005	0.030	2.3432	0.01	0.0136	0.0140	0.0140	0.0145	0.0123
0.010	0.035	4.6782	0.0175	0.0200	0.0273	0.0261	0.0268	0.0188
0.020	0.045	9.2939	0.0499	0.0449	0.0544	0.0557	0.0489	0.0462
0.030	0.055	13.9116	*0.0592	0.0667	0.0792	0.0715	0.0731	0.0697
0.040	0.065	18.4666	0.0900	0.0950	0.0907	0.0987	0.0840	0.0850
0.050	0.075	23.0244	0.1013	0.1085	0.1096	0.1047	0.1100	*0.1356
0.060	0.085	27.5203	0.1098	0.1104	0.1089	0.1108	0.1101	0.1009

Se mantuvieron constantes las concentraciones finales siguientes: [deuteroporfirina-Fe(III)]<sub>f</sub> = 0.014mM; [guayacol]<sub>f</sub> = 0.16 mM. La concentración de la solución de peróxido de hidrógeno de la cual se tomaron los diferentes volúmenes reportados fue de 1415 mM. V<sub>n</sub> (n = 1-6) son las velocidades iniciales que se midieron en un tiempo de 20 segundos de reacción. \*Datos con una gran dispersión que no pasaron la prueba Q y fueron descartados.

Los datos de las mediciones cinéticas de los complejos de porfirina-Fe(III)-picdien y sus porfirinas precursoras se trataron de igual manera. Las tablas correspondientes se encuentran en el apéndice 2 y se presentan las gráficas correspondientes como uno de los resultados de este estudio cinético.

Tabla 24. Tratamiento estadístico de los datos reportados en la Tabla 23.

$V_i$ prom.	R	S	$v$ (%)	$\mu$ 0.95	$\mu$ 0.99
0.0131	0.0042	0.0016	12.20	0.0017	0.0026
0.0228	0.0093	0.0045	19.50	0.0037	0.0058
0.0500	0.0108	0.0043	8.60	0.0043	0.0068
0.06990	0.0200	0.0067	9.60	0.0080	0.0126
0.0907	0.0147	0.0057	6.20	0.0059	0.0092
0.1068	0.087	0.0037	3.50	0.0035	0.0055
0.1100	0.0093	0.0041	3.70	0.0037	0.0058

R = rango; S = desviación estándar (tomado como error);  $v$  = varianza ;  $\mu$  = intervalo de confiabilidad.<sup>136</sup>

### III. 3 Presentación de datos.

Las Figuras 37a-c contienen las gráficas de velocidad inicial vs. variación de la concentración final de cada uno de los reactivos  $[\text{guayacol}]_f$ ,  $[\text{porfirina-pinza}]_f$  y  $[\text{peróxido de hidrógeno}]_f$ , mantenido en cada caso constantes las concentraciones de los otros de reactantes.

Se mantuvieron constantes las concentraciones de peróxido de hidrógeno y de cada uno de los complejos 5-7. Obsérvese que las velocidades iniciales permanecen constantes en intervalo de concentraciones de guayacol de 0.11-0.20 mM para los tres complejos de porfirina-Fe(III)-picdien.

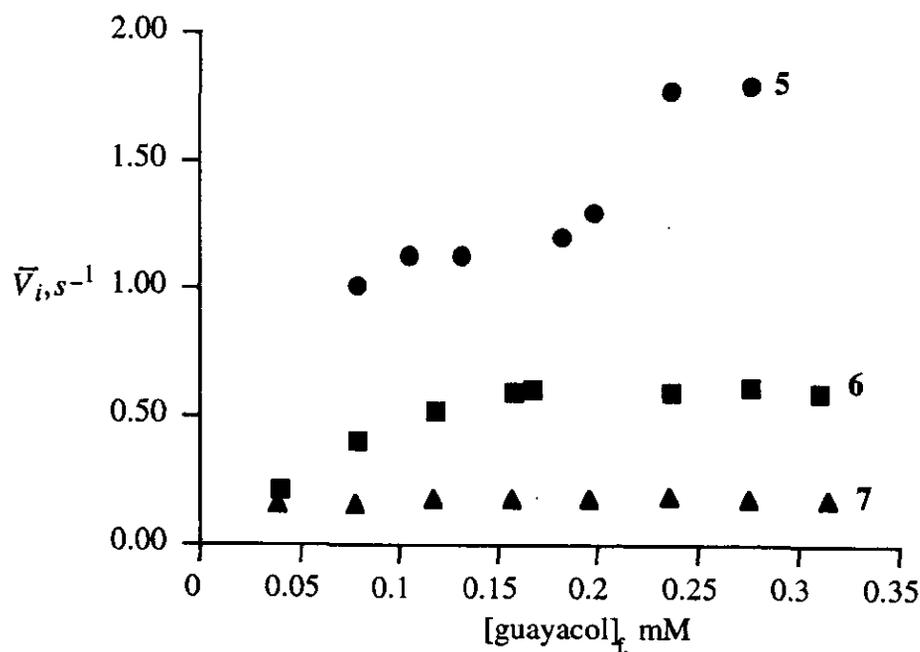


Figura 37a. Gráfica de la variación de la velocidad inicial en función de la variación de la concentración final de guayacol.

Se observa en la última gráfica que cuando se aumenta la concentración de complejo de porfirina-Fe(III)-picdien, sucedió lo mismo para las porfirina-Fe(III) iniciales, y no se observa la saturación por lo menos en los intervalos de concentraciones que se utilizaron para este estudio. Nuevamente los complejos que se estudiaron en esta investigación se comportan como

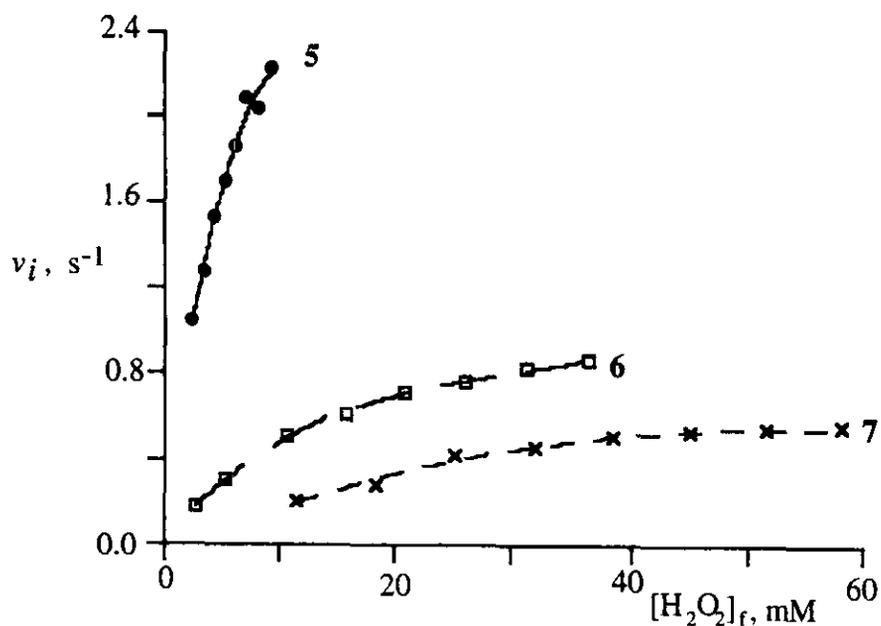


Figura 37b. La velocidad inicial se incrementa cuando también se incrementa la concentración de peróxido. La saturación es inminente. Es un comportamiento típico de Michaelis-Menten de los complejos 5-7 que se estudiaron en este trabajo.

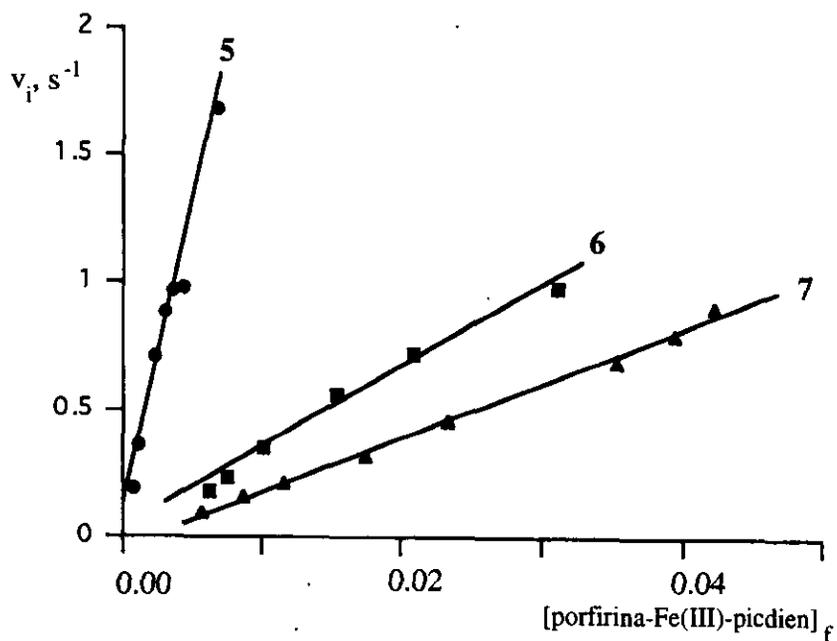
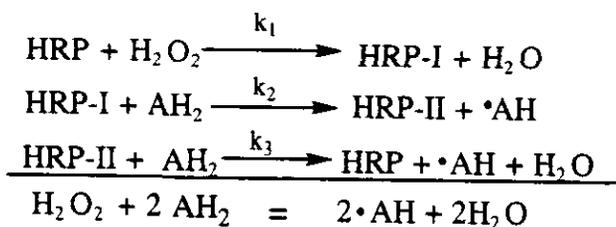


Figura 37c. La velocidad inicial se incrementó con el incremento de la concentración de porfirina-pinza.

Se observa en la última gráfica que cuando se aumenta la concentración de complejo de porfirina-Fe(III)-picdien, sucede lo mismo para las porfirina-Fe(III) iniciales, y no se observa la saturación por lo menos en los intervalos de concentraciones que se utilizaron para este estudio. Nuevamente los complejos que se estudiaron en esta investigación se comportan como la enzima nativa.<sup>128</sup>

### III.4 El modelo cinético de peroxidasa.

El ciclo normal de peroxidasa<sup>128</sup> se representa por las tres ecuaciones químicas del Esquema I:

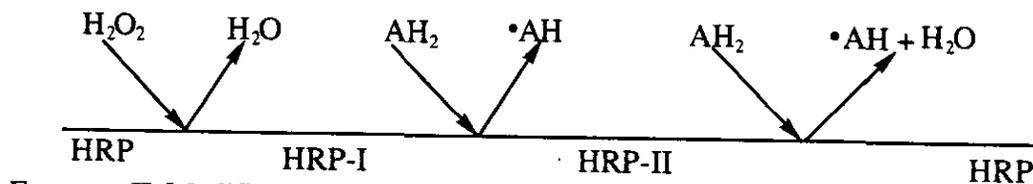


Esquema I. Ciclo normal para peroxidasas con la reacción total.

donde HRP-I y II son los Compuestos I y II intermediarios para la peroxidasa de rábano blanco o horseradish; AH<sub>2</sub> es el compuesto reductor (guayacol), y ·AH es un producto radical libre. Se observa que la enzima se oxida por dos electrones e inmediatamente se reduce por dos electrones en dos etapas subsecuentes.

Dependiendo del tipo de reductor que se utilice existen diferentes posibilidades para el radical libre que se forma. Puede reaccionar con otra molécula de sustrato o con otra especie causándole cooxidación.

Otra representación del ciclo normal de peroxidasa que da lugar al nombre de cinética de ping-pong peroxidasa (para estas enzimas), o de líneas paralelas es (Esquema II):



Esquema II. Modificación a la cinética de ping-pong referida a la peroxidasa de rábano blanco (HRP).

El esquema convencional de ping-pong (Esquema III; arreglo de dos sustratos y dos productos) es:



Esquema III. E representa la enzima en reposo (complejos de FeP-picdien); EA es el intermediario enzima-peróxido de hidrógeno o complejo modelo-peróxido de hidrógeno; F la enzima modificada covalentemente (intermediario antes de la formación del Compuesto-I, FeP-picdien-I); A y B reactantes (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y guayacol respectivamente); FB intermediario CompuestoI-guayacol; P y Q productos.

### III.5 Determinación de las constantes de Michaelis, velocidad máxima y segundo orden.

Para analizar los datos de velocidades iniciales se utiliza la siguiente ecuación (23):

$$\frac{[E]_0}{v} = \frac{K_A}{k_{cat}} \frac{1}{[A]} + \frac{1}{k_{cat}} \left( 1 + \frac{K_B}{[B]} \right) \quad (23)$$

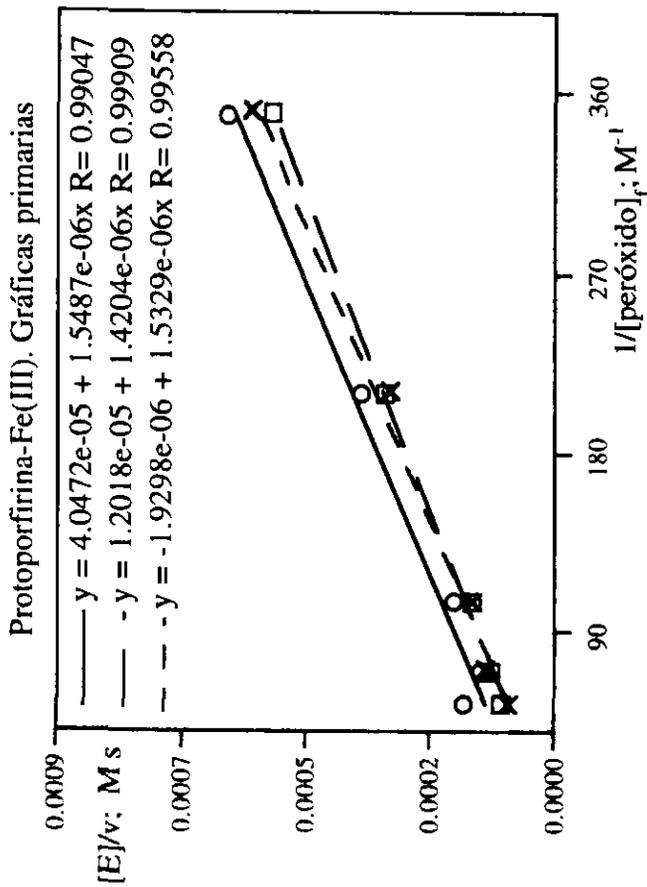
$[E]_0$  es la concentración total de la enzima;  $v$  velocidad inicial;  
 $K_A$  y  $K_B$  constantes de Michaelis;  $k_{cat}$  constante de velocidad máxima teórica  
o constante de velocidad de segundo orden.

Si la concentración de  $[B]$  (guayacol) se mantiene constante la gráfica de  $[E]_0/v$  versus  $1/[A]$  (peróxido de hidrógeno) será una línea recta. Así, para cada nuevo valor de la concentración de  $[B]$  se tiene una línea recta que será paralela a la anterior. Al conjunto de líneas paralelas se le conoce como *gráficas primarias*.

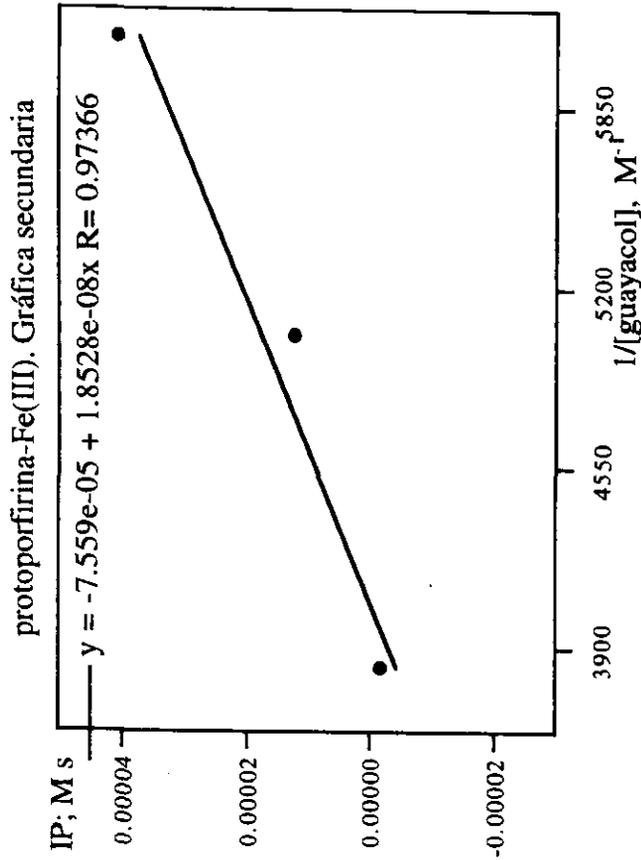
La intercepción ( $[E]_0/v$ ) de cada una de la líneas paralelas al eje de las ordenadas está dada por la ecuación (23);

$$\text{Intercepción Primaria} = \frac{K_B}{k_{cat}} \frac{1}{[B]} + \frac{1}{k_{cat}} \quad (23)$$

A la gráfica obtenida a partir de la ecuación (23) se le conoce como *gráfica secundaria*. Analizando esta última ecuación se observa que de la gráfica secundaria se pueden calcular los valores de  $k_{cat}$  a partir del recíproco de la intercepción en el eje de las abscisas; la constante de Michaelis  $K_B$  a partir del recíproco de la intercepción en el eje de las ordenadas; el recíproco de la pendiente ( $m = K_B/k_{cat}$ ) proporcionará el valor de la constante de segundo orden. Por último, se calcula la constante de Michaelis  $K_A$  de las gráficas primarias en el promedio de los recíprocos de las intercepciones en el eje de las abscisas. El recíproco del promedio de las pendientes ( $m_{prom.} = \underline{m}$ ) da el valor de la constante de segundo orden que debe coincidir con la calculada a partir de la gráfica secundaria. El error considerado es el de la desviación estándar.

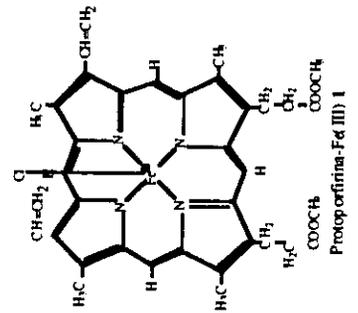


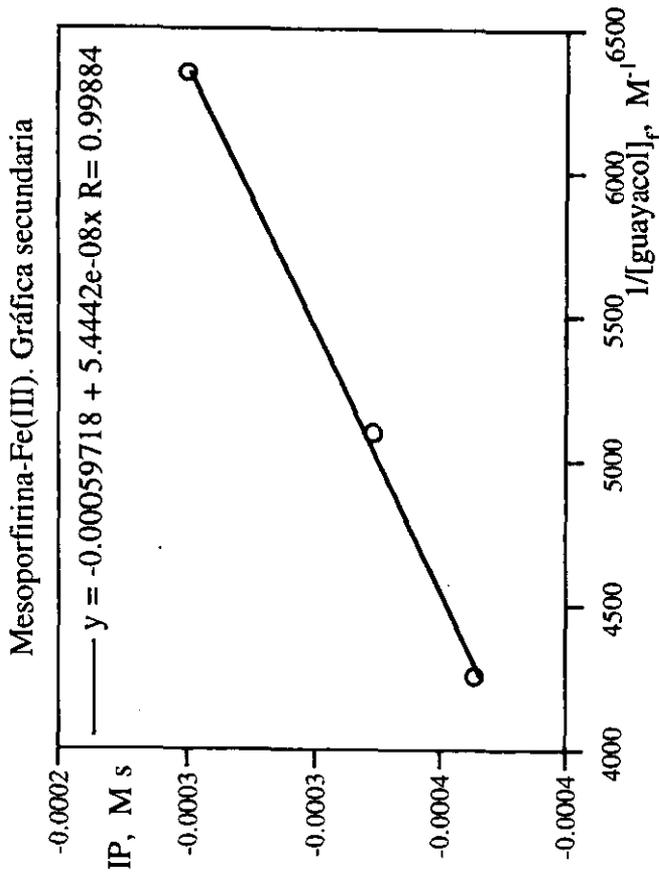
$= K_A/k_{cat} = 1.5007 \times 10^{-6} \text{ M}^2 \text{ s}^{-1}$   
 $A = 1.9852 \times 10^{-2} \text{ M}$



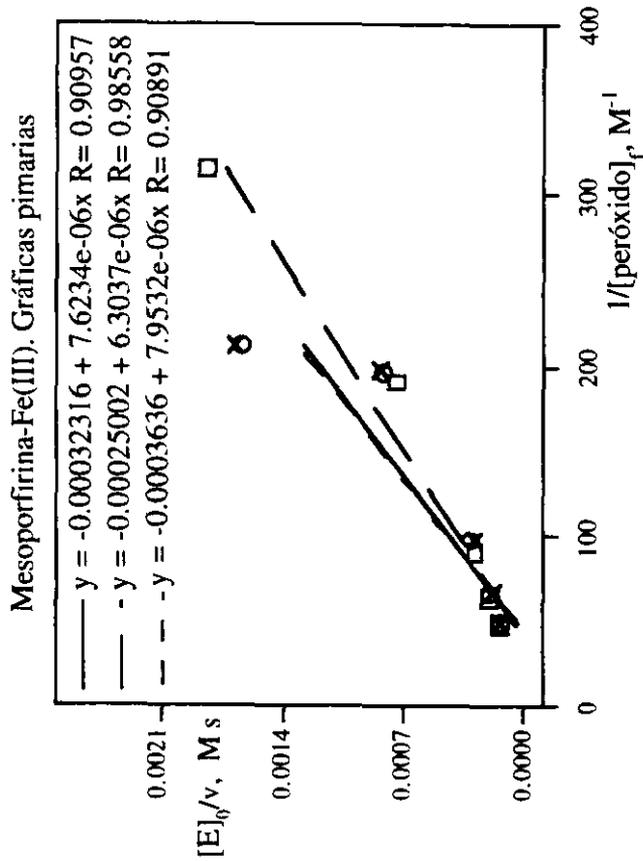
$y = 0, x = 1/K_B = 4079.7711 \text{ mM}^{-1}; K_B = 2.4511 \times 10^{-4} \text{ M};$   
 $x = 0, y = 1/k_{cat} = 7.559 \times 10^{-5}; k_{cat} = 1.3229 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1};$   
 $m = K_B/k_{cat} = 1.8528 \times 10^{-8} \text{ M}^2 \text{ s}; k_{cat} = 1.3229 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Figura 38. Gráfica de  $([E]_0/v)$  vs.  $1/[A]$  (izquierda) para el compuesto 1.  $[E]_0 = 0.014 \text{ mM}$ ,  $[\text{guayacol}] = 0.1639, 0.1986$  y  $0.2610 \text{ mM}$ .  
 $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2.8-18.8 \text{ mM}$ .  $\text{pH} = 6.59$ . A la derecha se muestra la gráfica secundaria con intercepción a la abscisa en  $4079.77$  y con un  
 valor de la pendiente de  $1.8528 \times 10^{-8} \text{ M}^2 \text{ s}$ .



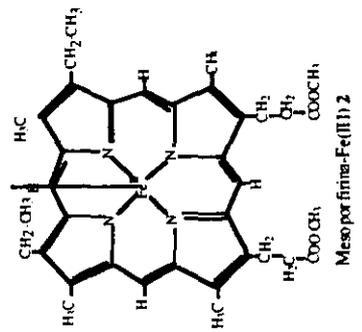


$y = 0, x = 1/K_B = 10\ 967.635 \text{ M}^{-1}; K_B = 9.1162 \times 10^{-5} \text{ M}$   
 $x = 0, y = 1/k_{\text{cat}} = 5.972 \times 10^{-4}; k_{\text{cat}} = 1.6745 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$   
 $m = K_B/k_{\text{cat}} = 5.4442 \times 10^{-8} \text{ M}^2 \text{ s}; k_{\text{cat}} = 1.6745 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

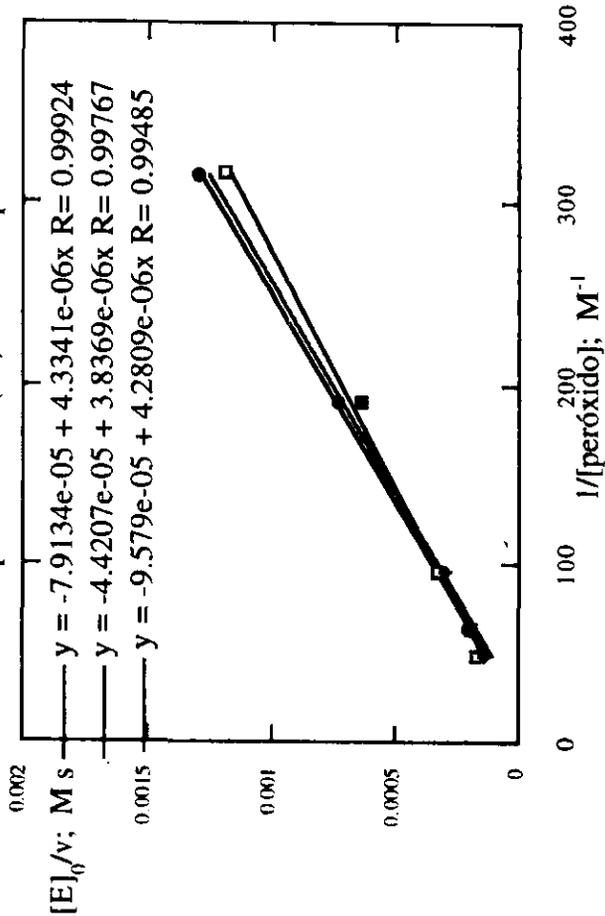


$= K_A/k_{\text{cat}} = 7.2935 \times 10^{-6} \text{ M}^2 \text{ s}^{-1}$   
 $\lambda = 1.2213 \times 10^{-2} \text{ M}$

Figura 39. Gráfica de  $([E]_0/v)$  vs.  $1/[A]$  (izquierda) para el compuesto 2.  $[E]_0 = 0.014 \text{ mM}$ ,  $[\text{guayacol}] = 0.1574, 0.1964$  y  $0.235 \text{ mM}$ .  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 3-21 \text{ mM}$ .  $\text{pH} = 6.89$ . A la derecha se muestra la gráfica secundaria con intercepción a la abscisa en  $10\ 969.472$  y con un valor de la pendiente de  $5.4442 \times 10^{-8} \text{ M}^2 \text{ s}$ .



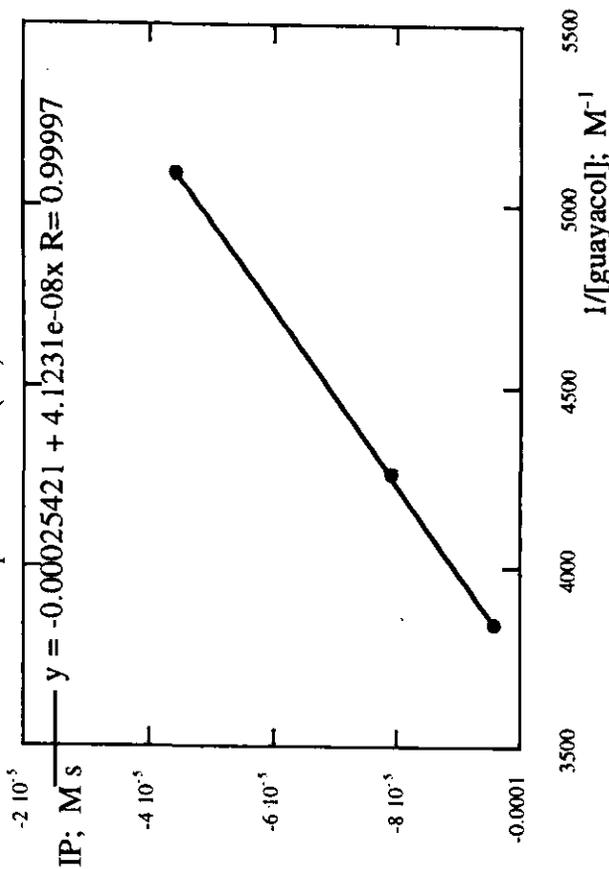
Deuteroporfirina-Fe-(III). Gráficas primarias



$$= K_A/k_{cat} = 7.3042 \times 10^{-5} \text{ M}^2 \text{ s}^{-1}$$

$$\lambda = 1.4690 \times 10^{-1} \text{ M}$$

Deuteroporfirina-Fe(III). Gráfica secundaria

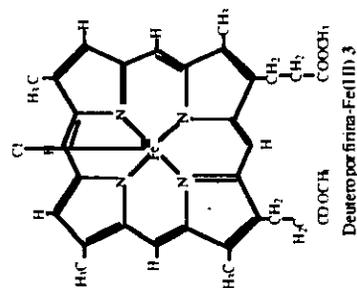


$$y = 0, x = 1/K_B = 7\ 648.07 \text{ M}^{-1}; K_B = 1.2615 \times 10^{-4} \text{ M}$$

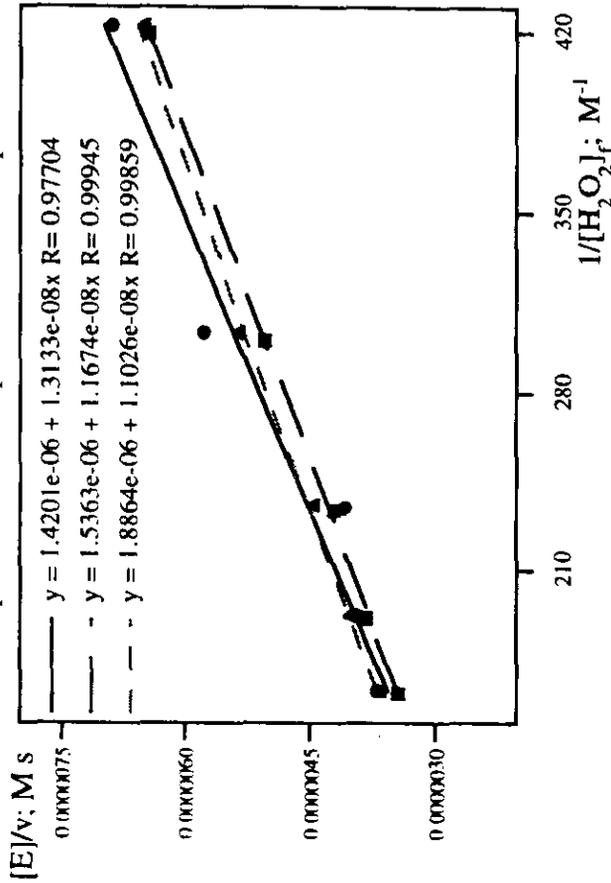
$$x = 0, y = 1/k_{cat} = 1.7929 \times 10^{-4}; k_{cat} = 5.5804 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$m = K_B/k_{cat} = 2.2607 \times 10^{-8} \text{ M}^2 \text{ s}; k_{cat} = 5.5804 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Figura 40. Gráfica de  $([E]_0/v)$  vs.  $1/[A]$  (izquierda) para el compuesto 3.  $[E]_0 = 0.0147 \text{ mM}$ ,  $[\text{guayacol}] = 0.1964, 0.2352$  y  $0.2605 \text{ mM}$ .  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 3-21 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7.00$ . A la derecha se muestra la gráfica secundaria con intercepción a la abscisa en  $7\ 648.07$  y con un valor de la pendiente de  $2.2607 \times 10^{-8} \text{ M}^2 \text{ s}$ .



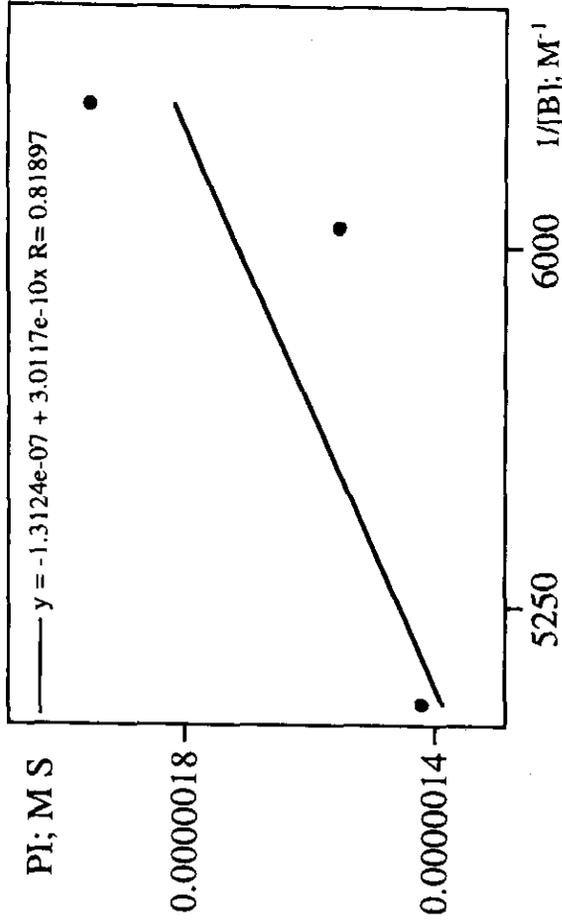
Protoporfirina-Fe(III)-picdien. Gráficas primarias.



$$= K_A/k_{cat} = 1.1944 \times 10^{-8} \text{ M}^2 \text{ s}^{-1}$$

$$= 9.1009 \times 10^{-2} \text{ M}$$

Protoporfirina-Fe(III)-picdien. Gráfica secundaria

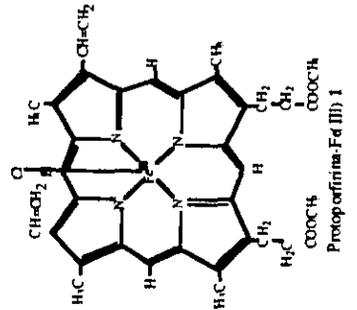


$$y = 0, x = 1/K_B = 435.76 \text{ M}^{-1}; K_B = 2.2948 \times 10^{-3} \text{ M}$$

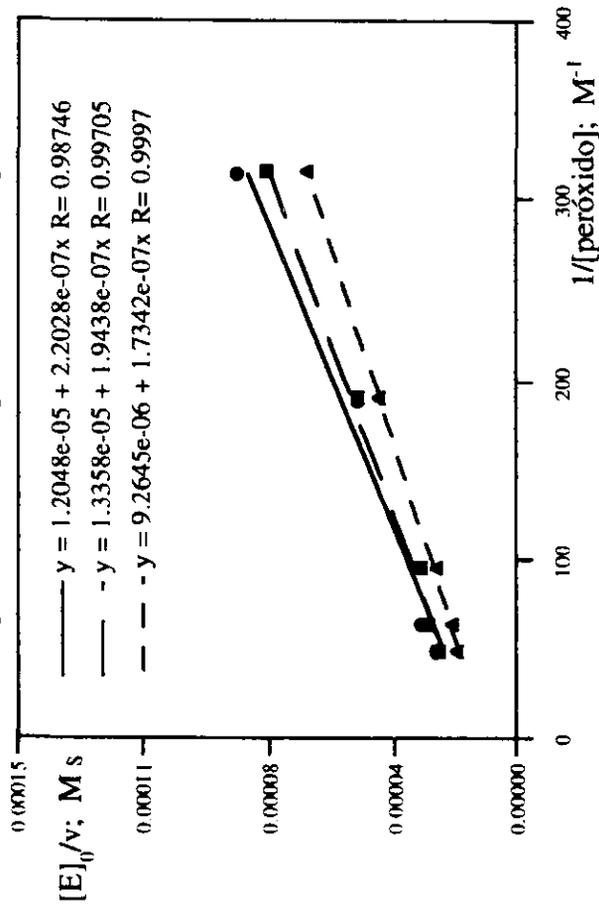
$$x = 0, y = 1/k_{cat} = 1.3124 \times 10^{-3}; k_{cat} = 7.6196 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$m = K_B/k_{cat} = 3.0117 \times 10^{-10} \text{ M}^2 \text{ s}; k_{cat} = 7.6196 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Figura 41. Gráfica de  $([E]_0/v)$  vs.  $1/[A]$  (izquierda) para el compuesto 5.  $[E]_0 = 0.0068 \text{ mM}$ ,  $[\text{guayacol}] = 0.1588, 0.1655$  y  $0.1981 \text{ mM}$ .  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2-6.3 \text{ mM}$ .  $\text{pH} = 6.28$ . A la derecha se muestra la gráfica secundaria con intercepción a la abscisa en  $435.76 \text{ M}^{-1}$  y con un valor de la pendiente de  $3.0117 \times 10^{-10} \text{ M}^2 \text{ s}$ .



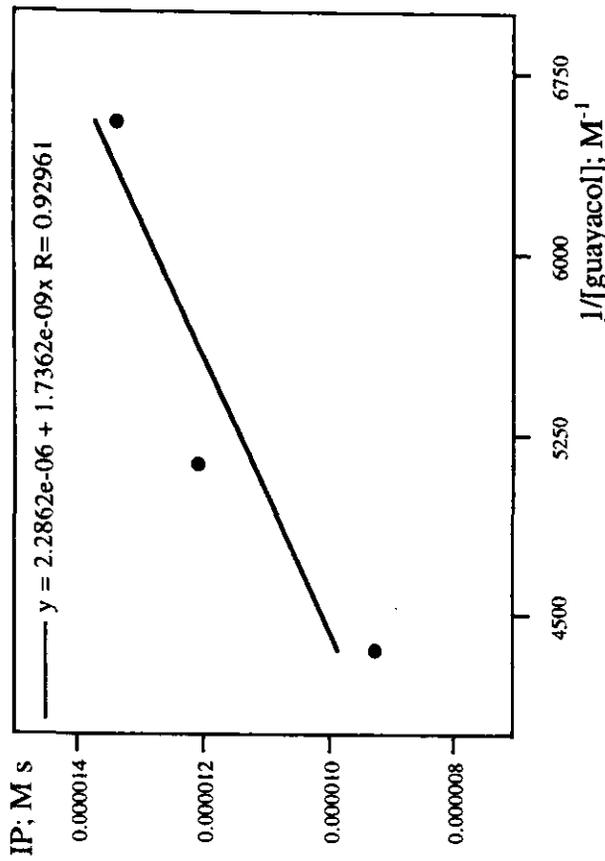
Mesoporfirina-Fe(III)-picdien. Gráficas primarias



$$= K_A/k_{cat} = 1.9603 \times 10^{-7} \text{ M}^2 \text{ s}^{-1}$$

$$= 8.5738 \times 10^{-2} \text{ M}$$

Mesoporfirina-Fe(III)-picdien. Gráfica secundaria

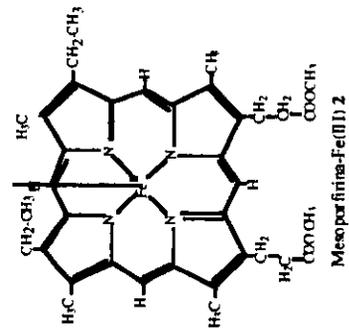


$$y = 0, x = 1/K_B = 1\ 316.90 \text{ M}^{-1}; K_B = 7.59 \times 10^{-4} \text{ M}$$

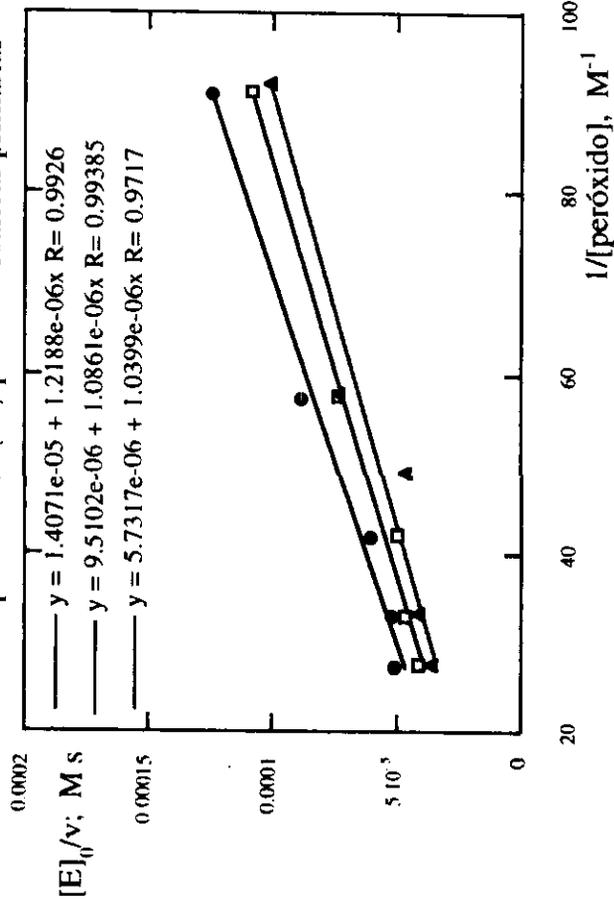
$$x = 0, y = 1/k_{cat} = 2.2864 \times 10^{-6}; k_{cat} = 4.3737 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$m = K_B/k_{cat} = 1.7362 \times 10^{-9} \text{ M}^2 \text{ s}; k_{cat} = 4.3737 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Figura 42. Gráfica de  $([E]_0/v)$  vs.  $1/[A]$  (izquierda) para el compuesto 6.  $[E]_0 = 0.017 \text{ mM}$ ,  $[guayacol] = 0.1526, 0.1954$  y  $0.23 \text{ mM}$ .  $[H_2O_2] = 3-21 \text{ mM}$ . pH = 6.57. A la derecha se muestra la gráfica secundaria con intercepción a la abscisa en  $1\ 316.90 \text{ M}^{-1}$  y con un valor de la pendiente de  $1.7362 \times 10^{-9} \text{ M}^2 \text{ s}$ .

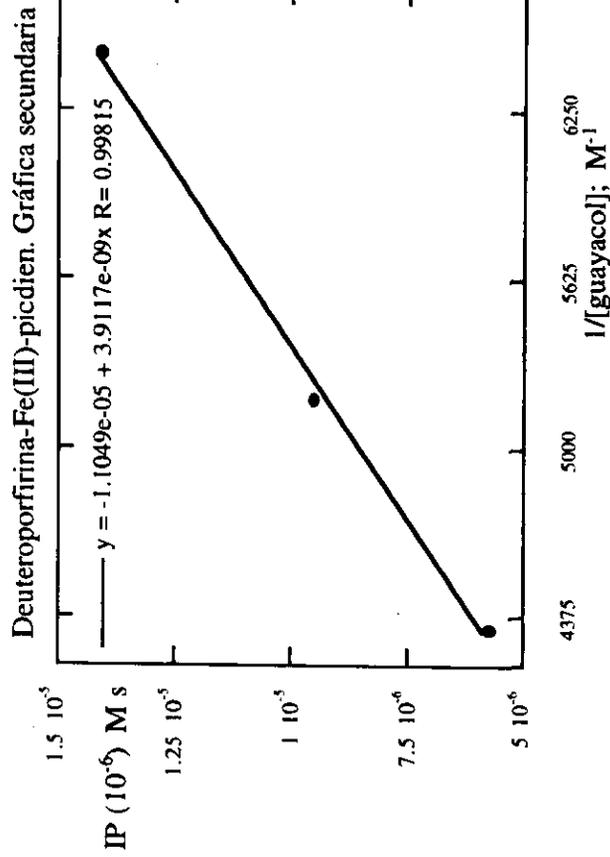


Deuteroporfirina-Fe(III)-picdien. Gráficas primarias



$$= K_A/k_{\text{cat}} = 1.1149 \times 10^{-6} \text{ M}^2 \text{ s}^{-1}$$

$$v = 1.0 \times 10^{-1} \text{ M}$$

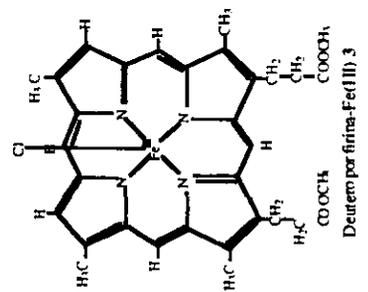


$$y = 0, x = 1/K_B = 2824.60 \text{ M}^{-1}; K_B = 3.54 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$x = 0, y = 1/k_{\text{cat}} = 1.1049 \times 10^{-5} \text{ k}_{\text{cat}} = 9.050 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$m = K_B/k_{\text{cat}} = 3.9117 \times 10^{-9} \text{ M}^{-2} \text{ s}; k_{\text{cat}} = 9.050 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Figura 43. Gráfica de  $([E]_0/v)$  vs.  $1/[A]$  (izquierda) para el compuesto 7.  $[E]_0 = 0.017 \text{ mM}$ ,  $[\text{guayacol}] = 0.155, 0.1930$  y  $0.2307 \text{ mM}$ .  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10\text{-}43 \text{ mM}$ .  $\text{pH} = 6.50$ . A la derecha se muestra la gráfica secundaria con intercepción a la abscisa en  $2824.60 \text{ M}^{-1}$  y con un valor de la pendiente de  $3.9117 \times 10^{-9} \text{ M}^2 \text{ s}$ .



### III. 6 Presentación de resultados. Discusión y conclusiones.

Con base en los valores de las Tablas reportadas en el Apéndice 2 se obtuvieron las gráficas primarias y las secundarias para cada uno de los complejos de porfirina-Fe(III) y porfirina-Fe(III)-picdien preparados (Figuras 38-43). Utilizando las ecuaciones de las rectas ajustadas por mínimos cuadrados se obtuvieron los valores de las constantes de Michaelis ( $K_A$  y  $K_B$ ), velocidad máxima ( $k_{cat.}$ ) o de segundo orden de acuerdo con el modelo propuesto. En la Tabla 23 se reportan los valores de las constantes de velocidad de primero y segundo orden y las de Michaelis respecto al peróxido y al guayacol.

Table 23. Constantes de Michaelis y de velocidad máxima teórica obtenidas experimentalmente.

Complex		$K_A, M$	$K_B, M$	$k_{cat}, M^{-1} s^{-1}$
Protoporfirina-Fe(III)	(1)	$1.99 \times 10^{-2}$	$2.45 \times 10^{-4}$	$1.32 \times 10^4$
Protoporfirina-Fe(III)-picdien	(5)	$9.10 \times 10^{-2}$	$2.29 \times 10^{-3}$	$7.62 \times 10^6$
Mesoporfirina-Fe(III)	(2)	$1.22 \times 10^{-2}$	$9.11 \times 10^{-5}$	$1.67 \times 10^3$
Mesoporfirina-Fe(III)-picdieno	(6)	$8.57 \times 10^{-2}$	$7.59 \times 10^{-4}$	$4.37 \times 10^5$
Deuteroporfirina-Fe(III)	(3)	$2.87 \times 10^{-1}$	$1.62 \times 10^{-4}$	$3.93 \times 10^3$
Deuteroporfirina-Fe(III)-picdieno	(7)	$1.00 \times 10^{-1}$	$3.54 \times 10^{-4}$	$9.05 \times 10^4$

Los valores de las constantes de Michaelis relativas al peróxido para los complejos porfirinas-Fe(III) solas 1 y 2 son más pequeñas que para porfirinas-hierro-picdien 5 y 6. Es lo contrario para los complejos 3 y 7.

Las constantes de velocidad máxima teórica de segundo orden ( $k_{cat.}$ ) que se obtienen directamente del tratamiento de datos en general muestran que es más pequeña para las hierroporfirinas sin el ligante axial picdien, pero los complejos que lo llevan aumentan considerablemente este valor de protoporfirina-Fe(III)-picdien 5 > mesoporfirina-Fe(III)-

picdien 6 > deuteroporfirina-Fe(III)-picdien 7.

Las constantes de orden uno  $k_1$  se obtienen multiplicando el valor de  $k_{2o. orden}$  por la concentración final de complejo utilizado en cada ensayo.

Comparando los datos obtenidos en esta investigación con los reportados en la Tabla 1 (página 95) resulta muy interesante el complejo de protoporfirina-Fe(III)-picdien porque el valor de la  $k_{cat}$  se encuentra alrededor de los valores reportados para esas peroxidasas nativas a  $pH = 7$ .<sup>131</sup>

Con respecto a otros modelos de peroxidasas reportados a partir de complejos de porfirinas-hierro(III) (Tabla 20) se puede ver que alguno de los modelos de Traylor<sup>55</sup> presenta una velocidad de catálisis diez veces menor que la del complejo de protoporfirina-Fe(III)-picdien 5, aún cuando tiene como quinto ligante un imidazol que es el ligante proximal elegido por la naturaleza en la *proxidasa de rábano blanco*. Es necesario mencionar que para los modelos de protoporfirina-Fe(III) de Jones y colaboradores<sup>134</sup> la constante de segundo orden reportada es mucho más pequeña que para el menos activo de los compuestos de porfirinas-Fe(III)-picdien que sintetizamos.

La aparición de coloración naranja en un tiempo de cinco minutos cuando a una solución con guayacol, porfirina-Fe(III)-picdien 5-7 (o porfirina-Fe(III) 1-3) o clorina-Cu(II)-picdien 8 se le agregó una solución de peróxido de hidrógeno, indicó sin lugar a dudas que los seis complejos con hierro(III) presentaban actividad de peroxidasas, no así el complejo de Cu(II). Consecuentemente la tarea inmediata fue hacer un estudio cinético de su comportamiento que permitiera evaluar la actividad catalítica de los modelos y obtener información sobre la estructura propuesta a partir de los estudios espectroscópicos para los compuestos que forman parte de la nueva familia a la que se ha denominado como porfirinas-pinza.

Se comprobó que cuando se mezcla guayacol con peróxido y se espera un tiempo razonable (24 horas) no se observa modificación alguna en la mezcla de reacción. Lo mismo pasó cuando se puso en contacto la hierroporfirina con guayacol. Sin embargo, cuando se hizo con hierroporfirina y peróxido se observó que la solución cambió a un color muy oscuro y al cabo de una hora de reacción se formó un precipitado negro muy semejante al carbono.

Las Figuras 37a-c muestran que manteniendo constantes las concentraciones de porfirina-Fe(III)-picdien o porfirina-Fe(III) y del peróxido de hidrógeno, la velocidad inicial se mantiene constante en un rango de concentración de guayacol entre 0.15 a 0.20 mM (Figuras 37a). Se procedió a mantener esa concentración final de guayacol en todos los ensayos de actividad de los seis complejos de hierroporfirinas. Esto se hizo para que el tratamiento de datos se simplificara utilizando el modelo de ping-pong peroxidasa que requiere de esta condición. Se independizó la velocidad de la reacción de la concentración de guayacol.

En cuanto a la variación de la velocidad inicial en función de la variación de la concentración de peróxido se observa un fuerte comportamiento de Michaelis-Menten con la relación hiperbólica entre la velocidad inicial y la concentración de sustrato que en este caso es el peróxido de hidrógeno. Se obtiene un estado estacionario o en equilibrio que indica que la velocidad de formación del intermediario es igual a la velocidad de su desaparición.

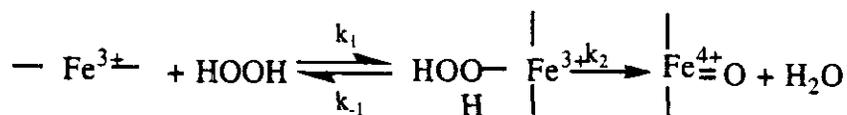
Bajo esas condiciones experimentales la ley de velocidad es:

$$\text{velocidad} = k_{\text{obs}}[\text{H}_2\text{O}_2][\text{Hierroporfirina}]$$

La velocidad es independiente de la concentración del guayacol de 0.1 a 0.2 mM, lo que indica que el guayacol reacciona con el intermediario tan rápido como se forma.

La reacción es de primer orden con respecto al peróxido de hidrógeno en un rango de concentraciones que no dan signo de saturación cinética. Esto indica que la etapa de

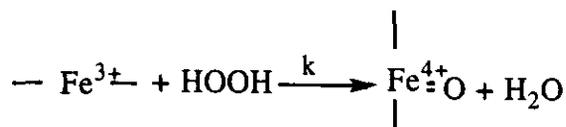
asociación o la de ruptura del enlace O-O del peróxido es la limitante (mecanismo I):<sup>59</sup>



Mecanismo I. La constante de velocidad máxima  $k_1$  observada

Sin embargo, las reacciones de asociación tales como  $k_1$  son generalmente rápidas y si fueran la etapa limitante podrían ser catalizadas por base. Esta reacción es mucho más sensible a los efectos electrónicos que la reacción de ruptura heterolítica sigue. Los efectos del peróxido con un radical R (ROOH) donador de electrones afecta más la etapa de ruptura del peróxido que la etapa de asociación del mismo. De hecho, en los experimentos que se realizaron en esta investigación, la reacción se lleva a cabo exitosamente en un  $\text{pH} \leq 7$  y es mejor aun en los complejos con ligante axial picdien. No obstante el estudio hecho por Baldwin y colaboradores,<sup>138</sup> indica que el pH en el cual el Compuesto I se forma más rápidamente para la MP-8 corresponde al  $\text{pK}_a = 11.8$  para el peróxido de hidrógeno, lo que significa que la reacción se lleva a cabo con el anión  $(\text{HO}_2)^-$ . Es necesario hacer el estudio correspondiente de la dependencia de la velocidad en función del pH para corroborar una u otra propuesta.

Es posible proponer el mecanismo en una sola etapa (mecanismo II):



Mecanismo II

Los dos mecanismos propuestos deben ser distinguidos cinéticamente. Si la primera etapa del mecanismo I alcanza el equilibrio rápidamente, entonces  $k_1[\text{H}_2\text{O}_2] \pm k_{-1} \gg k_2$  y  $[\text{H}_2\text{O}_2] \gg [\text{FeP}]$ , la constante de pseudo primer orden para los mecanismos I y II es:

$$k_{\text{obs}}^{\text{máx}} = k_2 \text{ y } K_M = (k_{-1} \pm k_2) / k_1$$

De hecho se ha observado por espectroscopía de UV-Vis la formación del intermediario llamado Compuesto 0 en condiciones de una alta concentración de peróxido, baja temperatura ( $< 16\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), en una mezcla de metanol-agua 50-50 v/v, por la técnica de *stopped flow*, indicando que hay una etapa elemental de reversibilidad, cuya transformación al Compuesto I es la etapa limitante.<sup>135</sup> Otros estudios de la formación reversible del Compuesto 0 se han reportado<sup>54,22</sup> y la conclusión de ellos es la misma: la etapa limitante del mecanismo es la ruptura heterolítica del enlace O-O del peróxido.

Los valores de las constantes de Michaelis para el peróxido de hidrógeno ( $K_A$ ) son muy semejantes a las esperadas de acuerdo con el comportamiento de la enzima nativa de *rábano blanco* (Tabla 20) para la que se reportan valores del orden de  $10^{-1}$  M. En el estudio hecho por Baek<sup>135</sup> el valor de esta constante se hace más pequeña por un orden de magnitud cuando las condiciones de pH se vuelven más ácidas, lo que hace pensar que la formación del anión peróxido facilita la adición del peróxido al hierro, aunque finalmente si no es determinante la presencia de esta anión para que se lleve a cabo esta parte de la reacción, si la mejora.

De acuerdo con los datos obtenidos para la serie de complejos porfirinas-pinza, y que fueron obtenidos bajo las mismas condiciones de reacción, los valores de las constantes,  $K_A$ , fueron casi iguales para todos los complejos, a excepción del complejo protoporfirina-Fe(III)-picdien, cuyas concentraciones fueron la mitad de las otras cuatro por la incapacidad de medir correctamente la variación de velocidad inicial. Se puede concluir de los valores de las constantes de Michaelis (Tabla 23) que la afinidad de los complejos de protoporfirina-Fe(III), mesoporfirina-Fe(III) y deuteroporfirina-Fe(III) es mayor que la de los correspondientes complejos con picdien. Esto era de esperarse de acuerdo con las estructuras diferentes de los complejos. En el caso de las hierroporfirinas solas, la afinidad del hierro (pentacoordinado con cloro o hexacoordinado con cloro y metanol) es mayor por la mayor facilidad de sustituir el metanol en la sexta posición que en el caso de los complejos hexacoordinados con el ligante picdien.

El ligante picdien tiene una cadena que une a los dos piridilos que se encuentran coordinados a través del nitrógeno al ion hierro(III). Esto provoca un impedimento estérico al peróxido que se acerca al Fe(III) por lo que disminuye su posibilidad de coordinarse, y en consecuencia necesita una concentración más alta de peróxido para que la reacción se lleve a cabo.

En la Figura 44 se muestra la gráfica de formación del posible intermediario cuando utilizamos concentraciones mucho más pequeñas de peróxido (diez veces) lo que favorece la acumulación de ese intermediario. Esto sucedió cuando se estaban buscando las condiciones en las que se llevarían a cabo las mediciones cinéticas.

#### Deuteroporfirina-Fe(III)-picdien + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observado a $\lambda = 500$ nm

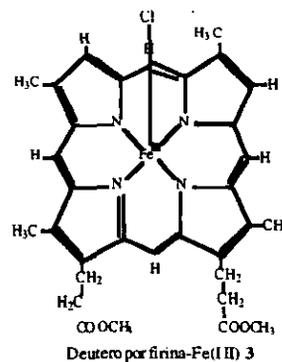
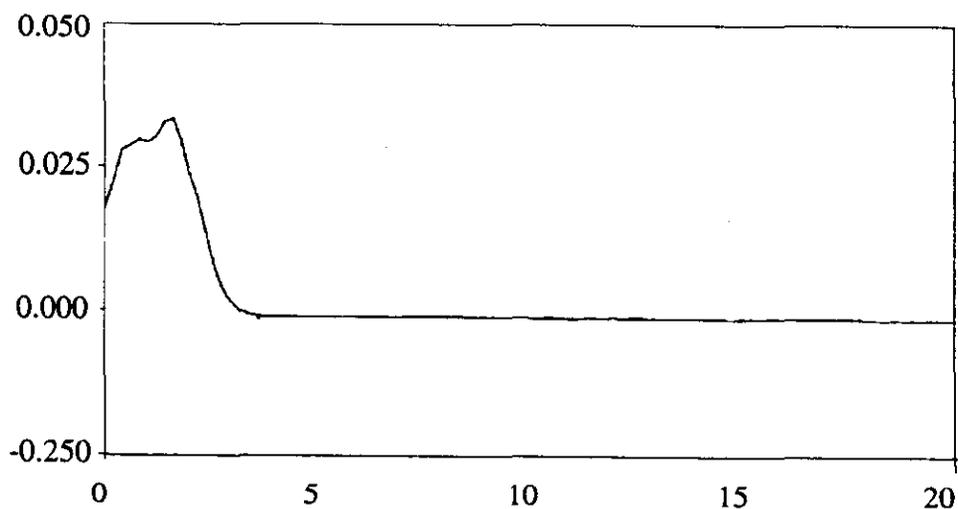


Figura 44. Gráfica de la formación del complejo intermediario que se forma cuando reacciona el complejo deuteroporfirina-Fe(III)-picdien 7 con peróxido de hidrógeno. Las concentraciones utilizadas fueron: [deuteroporfirina-Fe(III)-picdien] = 0.019 mM y de [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 156 mM

Se probaron diferentes concentraciones de peróxido hasta encontrar la óptima de 1500 mM, manteniendo fijas las concentraciones de hierroporfirina y guayacol. No se observó más que una cinética. El mismo efecto se observó para los otros dos complejos

mesoporfirina-Fe(III)-picdien y protoporfirina-Fe(III)-picdien pero no así para las porfirinas sin el ligante axial. También se probaron diferentes longitudes de onda y fue justo en 500 nm en la que se observó más completamente la formación de este intermediario.

De lo expuesto con relación a la etapa limitante del mecanismo propuesto y del comportamiento de los complejos con picdien ante concentraciones no tan altas de peróxido de hidrógeno, solo puede concluirse que la etapa de formación del Compuesto 0 alcanza el equilibrio rápidamente y por lo tanto la concentración de peróxido debe ser mucho más alta que la del complejo porfirina-pinza. La ruptura heterolítica debe ser la más lenta y en consecuencia se pudo ver espectroscópicamente su formación. En cuanto se forma el Compuesto I en alguna cantidad, inmediatamente desaparece posiblemente por autooxidación o por oxidación de otras moléculas del mismo complejo, y oxida inmediatamente al guayacol si está presente. Cuando en las gráficas de absorbancia vs. tiempo desaparece el pico de otra cinética previa o secundaria, se está igualando la velocidad de formación del Compuesto I con la de oxidación del guayacol. Por otro lado, la ausencia de la misma reacción con las hierroporfirinas libres de picdien indica que es más fácil desplazar un metanol de sexta posición que un piridilo, que quizá por la longitud de la cadena que lo une al otro piridilo queda coordinado asimétricamente y, por lo tanto, puede ser desplazado por el peróxido.

Con base en los estudios de Traylor<sup>57,58</sup> sobre la influencia del disolvente en la capacidad catalizadora de la protoporfirina-Fe(III) como peroxidasa se sabe que es la misma en metanol que en cloruro de metileno y en benceno. En ese mismo estudio Traylor demuestra que para los complejos tetramesitilhierroporfirina, tetrafenilhierroporfirina, protoporfirina-Fe(III), protoporfirina-Fe(III)DMA (hierroprotoporfirina-dimetilformamida) su actividad como peroxidasa es igual ante oxidantes como el ácido m-cloroperbenzóico utilizando como disolvente al metanol.

La presencia de los carboxilos de la hemina o de la base colidina acelera la velocidad de ruptura heterolítica del peróxido y, que tiene una estequiometría de estado de transición que comprende a la hemina, peróxido y base (Figura 45).

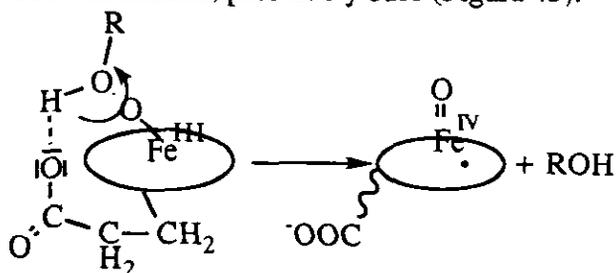


Figura 45. Catálisis interna de los grupos carboxilo que se ha comprobado aumentan la velocidad de ruptura heterolítica del peróxido

Cuando se utiliza como agente oxidante un perácido se ha detectado la formación de un ácido. Esto indica que el protón del percarboxilo se atrae con la base y fuerza a la ruptura heterolítica.

Se propone para los complejos de porfirinas-Fe(III)-picdien, a partir de los estudios por espectroscopía de RPE del complejo de clorofilina-picdien, en los que se pudo observar por la interacción superhiperfina, la interacción del cobre(II) con más de seis nitrógenos que los rodean. (cuatro de los pirroles de la porfirina, dos de los piridilos axiales y tres de la cadena que une a los piridilos), el establecimiento de un puente de hidrógeno entre el nitrógeno del piridilo del picdien y el hidrógeno del peróxido. Esto sucedería si uno de los piridilos del picdien se queda coordinado al Fe(III) de la porfirina y el otro se descoordina quedándose en las cercanías del ion metálico. Todo ello ocasionaría que la ruptura heterolítica del enlace O-O del peróxido fuera más rápida en estos complejos.

En el caso de los complejos que tienen dos imidazoles axiales unidos a través de uniones amídicas con los carboxilos de la porfirina, se ha comprobado que no mejoran la velocidad de la reacción de oxidación del complejo, por el contrario la aumentan. Esto es así por la competitividad que se establece entre las dos bases.

Los modelos de peroxidasa con metaloporfirinas que poseen en su estructura una

base proximal tienen constantes de velocidad mejores (pero no mayores que el complejo protoporfirina-Fe(III)-picdien **5**, que se reporta en este trabajo). Si esta base está unida a los carboxilos libres, da mejores resultados, así como la presencia de bases externas. Cuando la base es imidazol el protón del imidazol es captado por esa base y permite una mayor movilidad de densidad electrónica hacia el hierro(III). Los efectos son la movilidad de densidad electrónica hacia el metal, lo que acelera la ruptura heterolítica O-O del peróxido; en segundo término, esa misma alta densidad electrónica estabilizaría el alto estado de oxidación del hierro en el radical ferrilo que se propone para el Compuesto I.

En el caso de los complejos con picdien la presencia de dos piridilos axiales tiene una función más cercana a los imidazoles de la enzima, uno hace las veces del aditamento distal y otro el proximal para que, como en la enzima, se concierten esos movimientos de densidad electrónica empujando densidad electrónica una base y la otra jalándola.

En los modelos de peroxidasas la concentración de base interna o local es de 0.2 M, comparada con una concentración mayor que 20 para la enzima. La diferencia tan grande de la velocidad de reacción de la protohemina mono-3-(1'-imidazolil)-propilamidamonometiléster ( $12 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) con la de la HPR ( $1.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) o CCP ( $1.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), las tres con la misma porfirina que la naturaleza ha seleccionado para la mayoría de las metalohemoproteínas, sugiere que existe una extraordinaria actividad catalítica aparte o además de la que proporciona la hierroporfirina pentacoordinada con imidazol.<sup>57</sup>

En el caso de los complejos de hierroporfirinas-picdien las constantes de velocidad de segundo orden obtenidas indican que por lo menos el modelo que tiene a la protoporfirina logra por los aditamentos axiales que tiene una mayor reproducción de la capacidad catalítica del conjunto.

Siguiendo con la discusión de las constantes de Michaelis calculadas para el guayacol, se observa que dan valores más pequeños que las del peróxido y no nos sorprende en virtud de que el Compuesto I, que corresponde al complejo oxidado, es altamente inestable y reactivo. La presencia de la base proximal estabiliza suficientemente al intermediario para que la reacción lateral que sucede con las hierroporfirinas en presencia de peróxidos suceda más lentamente que la oxidación del guayacol.

Sin la presencia del guayacol, el Compuesto I que se forma a partir de los complejos de hierroporfirinas-picdien tendría más posibilidad de presentar la reacción de dimerización,  $\mu$ -oxo o  $\mu$ -peroxo, o de reaccionar autooxidándose (lo cual se observa a través de la espectroscopía de UV-Vis por la desaparición del Soret). Esto conduce nuevamente a proponer que el piridilo distal, de las porfirinas-pinza, permanezca cerca del metal e impida la dimerización de la metaloporfirina, sin que el segundo piridilo se descoordine. Uno de los experimentos que se hicieron para comprobar que esta reacción es mínima fue la de mantener la misma concentración de hierroprotoporfirina-picdien y agregar cantidades iguales de peróxido y de guayacol cada vez que se observaba que la meseta de la gráfica de formación de los productos de oxidación del guayacol empezaba a bajar. Esto se mantuvo por ocho horas y se notó que cada vez que se adicionaron los dos reactivos mencionados había un pequeñísimo escalón que nivelaba la meseta.

Lo anterior indica que el complejo de hierroporfirina-picdien estuvo actuando cíclicamente con poco deterioro. Esto no sucedió cuando se puso la hierroporfirina sola con el peróxido. Además se observó en el espectro de UV-Vis (con intervalos de dos minutos) que el pico de Soret disminuyó hasta desaparecer. En ese mismo espectro de UV-Vis, no se observó otra señal en otra longitud de onda que indicara la aparición la formación del intermediario. Estos estudios se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

La discusión de los valores de las constantes de velocidad de segundo orden es interesante, a partir de los reportes que indican que los sustituyentes periféricos de las

porfirinas no cambian su capacidad catalítica,<sup>57,58</sup> sin embargo, estas constantes de velocidad están determinadas por los sustituyentes axiales.<sup>128</sup> En este trabajo las diferencias entre los complejos que se prepararon fueron precisamente esos sustituyentes periféricos. La protoporfirina tiene dos vinilos en la posición 2, 4, la mesoporfirina dos etilos en esas mismas posiciones, y la deuteroporfirina tiene hidrógenos. Todos tienen la pinza picdien y todos fueron estudiados cinéticamente en las mismas condiciones.

La distinta actividad de los complejos con picdien se debe totalmente a la presencia de esa pinza, puesto que es la diferencia con las hierroporfirinas de partida con que se compararon las velocidades de reacción. No cabe duda que las diferencias entre los complejos con picdien se debe a los efectos que los aditamentos laterales de las porfirinas tienen conjuntamente con el picdien. De alguna manera la presencia de los vinilos (> electroatracción) en el complejo de protoporfirina-Fe(III)-picdien **5** provoca una mayor deslocalización electrónica, que aumenta con la presencia de los piridilos mediante los mecanismo de transferencia de espín ( $\sigma$  y  $\pi$ ), motivo por el cual los desplazamientos en RMN de protón se observan a frecuencias más altas. Los estudios espectroscópicos de RMN de protón (factor  $Q_{asim}$ ) de RPE (constantes de interacción superhiperfina diferentes), muestran que la coordinación axial de los piridilos del picdien a la porfirina-Fe(III) es no simétrica. Esto daría la posibilidad de proponer un mecanismo de reacción de los complejos porfirina-pinza con el peróxido de hidrógeno: *i* la separación de uno de los piridilos (el de menor fuerza de coordinación) permitiendo que el peróxido de hidrógeno se coordinara al hierro(III); *ii* la atracción de uno de los protones del peróxido de hidrógeno por el nitrógeno de la piridina que se separó; *iii* la coordinación permanente del otro piridilo (el de mayor fuerza de coordinación) que estabilizaría la estructura del intermediario Compuesto I, altamente inestable; *iv* todo lo anterior en un mecanismo concertado.

En la Figura 45 aparece la propuesta del mecanismo de reacción para los complejos de porfirinas-pinza como modelos de peroxidasas.

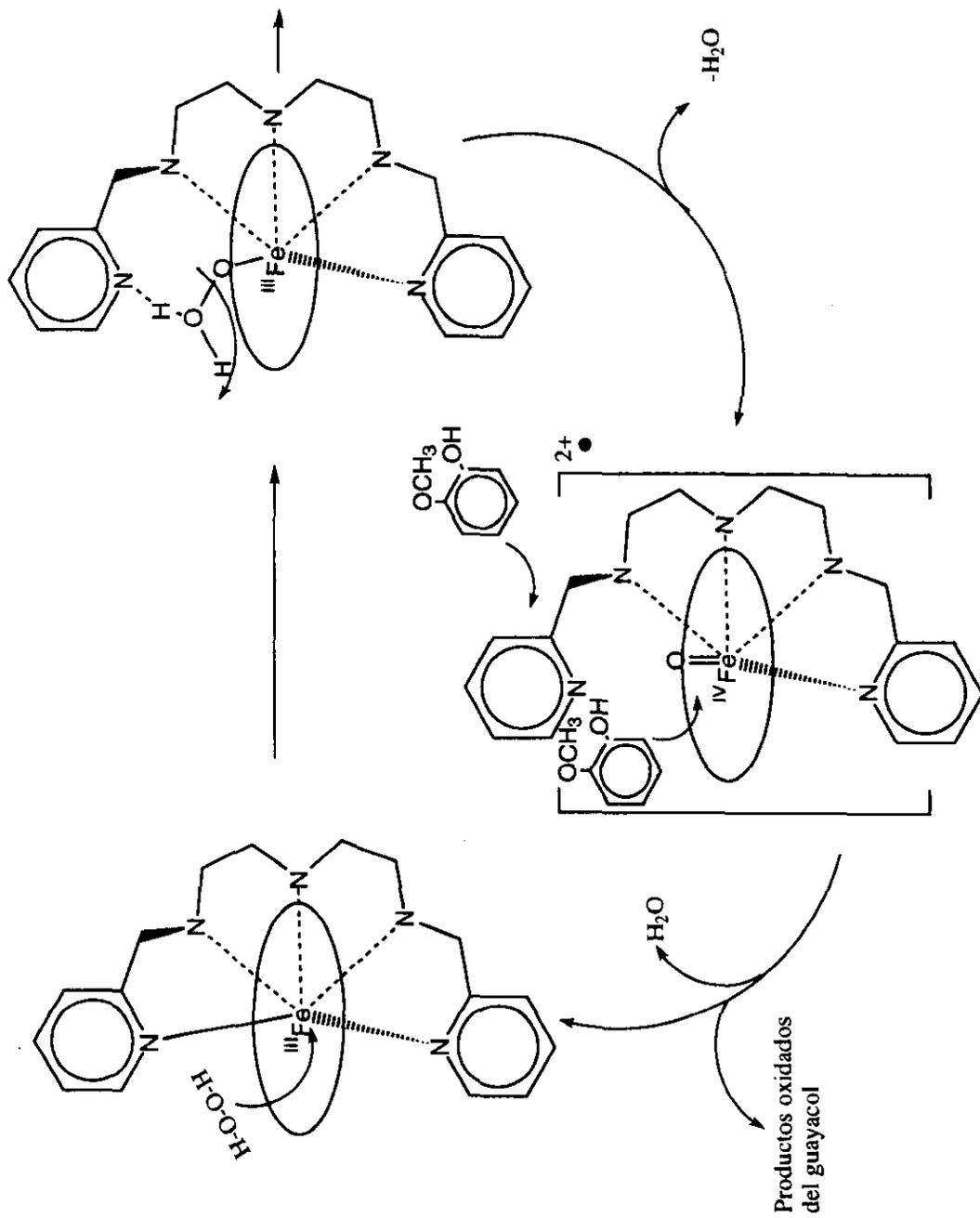


Figura 46. Propuesta del mecanismo general de catálisis de los modelos de peroxidasa, porfirinas-Fe(III)-picdien 4-7. Las líneas punteadas que aparecen en el esquema indican una posible interacción entre el ion metálico y los átomos de nitrógeno de la cadena que los une. Esta interacción se pudo observar en el complejo porfirina-pinza de Cu(II) 8, por espectroscopia de RPE.

Se prepararon tres modelos cinéticos de peroxidasa a partir de porfirinas-hierro(III) y picdien que resultaron ser excelentes modelos espectroscópicos y cinéticos, comparándolos con otros modelos reportados.

La presencia de los diferentes sustituyentes de las porfirinas-Fe(III) influyen *determinantemente en la actividad de los complejos sin y con picdien*. El ligante axial picdien marca una diferencia en la actividad catalítica como peroxidasa de los nuevos complejos **5-7**, con respecto a las porfirinas libres de picdien **1-3**, aumentándola mil veces para la protoporfirina-Fe(III)-picdien **5** respecto de la protoporfirina-Fe(III) **1**, cien veces para la mesoporfirina-Fe(III)-picdien **6** respecto de la mesoporfirina-Fe(III) **2**, y diez veces para la deuteroporfirina-Fe(III)-picdien **7** respecto de la deuteroporfirina-Fe(III) **3**.

Las constantes de velocidad de segundo orden para las porfirinas-Fe(III) libres de picdien **1-3** y porfirinas-Fe(III) con picdien **5-7**, es mayor de protoporfirina-Fe(III) > deuteroporfirina-Fe(III) ~ mesoporfirina-Fe(III), mientras que para los complejos de hierroporfirinas-picdien el comportamiento es: protoporfirina-Fe(III)-picdien **5** > mesoporfirina-Fe(III)-picdien **6** > deuteroporfirina-Fe(III)-picdien **7**.

Así como para la peroxidasa nativa se propone una mecanismo concertado para llevar a cabo la adición de peróxido y luego la ruptura heterolítica del enlace O-O del peróxido, el modelo obtenido refuerza el mecanismo de catálisis propuesto.<sup>42</sup>

Cuando se hicieron las pruebas experimentales para encontrar las mejores condiciones de la reacción característica de peroxidasa (con guayacol), que permitieran una medición más precisa de la velocidad inicial, se observaron las diferentes cinéticas de distintos productos de la reacción. Lo anterior sucedió cuando las concentraciones de peróxido eran menores que las concentraciones del complejos de porfirinas-pinza. Se hicieron intentos por separar estas dos cinéticas, para lo cual se varió la longitud de onda (450-500 nm) a la cual se midió la velocidad de formación de los productos de oxidación

del guaiacol. Se eliminó este sustrato para inhibir la cinética de oxidación del guayacol, y se encontró que a 500 nm se observaban perfectamente las gráficas de los productos de reacción entre cada complejo de porfirina-Fe(III)-picdien **5-7** y el peróxido de hidrógeno reacción. De acuerdo al mecanismo propuesto<sup>42</sup> correspondería al Compuesto 0 y el Compuesto I, o bien a los intermediarios Compuestos I y II (Figura 44, página 121).

Por último, la actividad vista a través de los valores de las constantes de Michaelis y de la velocidad máxima teórica para cada complejo, refuerzan la propuesta de la probable estructura de las porfirinas-pinza . En sentido inverso la propuesta de la posible estructura de estos complejos explica los valores de esas constantes.

## CAPÍTULO IV

### ESTUDIOS ESPECTROSCÓPICOS DE LA REACCIÓN DE LOS COMPLEJOS DE HIERROPORFIRINAS-PID CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

#### IV.1 Antecedentes

El tiempo de vida media tan corto de los intermediarios que se forman durante el ciclo catalítico de las enzimas peroxidasa, Compuestos I y II, ha hecho imposible su caracterización espectroscópica por UV-Vis,<sup>50,137</sup> RMN de  $^1\text{H}$ ,<sup>50,138</sup> RPE<sup>50,139</sup> y Mössbauer.<sup>50,140</sup> Esto ha llevado a los grupos de investigación de esta área a seguir intentándolo.

Desde 1974 Dolphin y Felton<sup>141</sup> propusieron que el radical  $\pi$ -catiónico-porfirínico se forma por la sustracción de un electrón que se encuentra en uno de los orbitales moleculares  $a_{1u}$  y  $a_{2u}$  cercanamente degenerados de la porfirina, consistente con una simetría  $D_{4h}$ . La posición relativa de los orbitales moleculares de acuerdo a la simetría del complejo porfirínico, determina una mayor vulnerabilidad para oxidar las posiciones meso del anillo hemo y esto establece las diferencias de comportamiento de las 5,10,15,20-tetraaril-porfirinas (sustituídas en las posiciones meso) y las heminas. Para la protohemina el orbital molecular  $a_{1u}$  es más alto en energía que el  $a_{2u}$  y eso le confiere al radical  $\pi$ -catiónico una simetría  $a_{1u}$ . Los estudios teóricos más recientes acerca del orden relativo de los orbitales moleculares de frontera indican que los sustituyentes periféricos, ion metálico y ligantes axiales influyen determinadamente en la separación energética de los orbitales  $a_{1u}$  y  $a_{2u}$ .<sup>136</sup>

Estudios realizados por otros grupos de investigación con algunos de los modelos obtenidos a partir de hierroporfirinas se muestran en la Tabla 25.

Los estudios del radical porfirínico  $\pi$ -catiónico por espectroscopía UV-Vis<sup>49,137,50</sup> informan acerca de la posición de la banda de Soret ligeramente desplazada hacia el UV cercano, de baja intensidad y ancha. Las bandas en la región visible varían de acuerdo a la mezcla de radical ferrilo y del ferrilo (Compuesto I y Compuesto II, respectivamente), la cual presenta una banda característica en la región de 550 nm y un Soret más intenso. En el caso de la existencia de radical ferrilo puro se observa una sola banda en la región de 660-690

Tabla 25. Características espectroscópicas del Compuesto I propuesto a partir de complejo modelos y de enzimas peroxidasa.

Complejo	UV-Vis nm	RMN de $^1\text{H}$ , $\delta$ ppm H-hemo	EPR	Ref.
*[Fe(IV)=O(TDCPP)] <sup>+</sup>	391, 678	60.8	4.26, 3.62, 1.98	50
**Fe(IV)(TTMPP)] <sup>+</sup>	394, 670	33.2	3.71, 3.71, 1.99	50
Fe(IV)=O(TMP)] <sup>+</sup>	406, 674	27	4.47, 3.50, 1.98	50
deutero-HRP-I	410, 680	110, 90		143
HRP-I		76.25, 74.00		144
HRP-II		14-17		144

\*[tetrakis(2,6-diclorofenil)porfirinato]-Fe(III). \*\*[tetrakis(2,4,6-trimetoxifenil)porfirinato]-Fe(III). \*\*\*[tetramesitil-porfirinato]-Fe(III)

Los datos espectroscópicos (Tabla 25) indican que existe una gran disparidad en cuanto al comportamiento de lo que se ha reportado como características espectroscópicas de los Compuesto-I y II de la peroxidasa de rábano blanco y los modelos de porfirinas-Fe(III), o bien que se están obteniendo diferentes productos de oxidación dependiendo de los reactivos y condiciones de reacción. Se puede observar que el comportamiento espectroscópico de RMN de protón es un poco más coincidente entre los modelos y con el complejo de peroxidasa.

Uno de los estudios hechos por espectroscopía de RMN de protón con peroxidasa de rábano blanco<sup>142</sup> y peróxido de hidrógeno muestra un cambio dramático en la forma y los desplazamientos del intermediario formado, y que se presume es el Compuesto II.

Las posiciones de las resonancias de los H-hemo para los modelos de Compuesto I que aparecen en la Tabla 25 para los espectros de RMN de protón varían en los modelos y son diferentes a los reportados para el HRP-I. Pero todos los resultados de los modelos tienen esos desplazamientos entre 14 ppm a -60 ppm.

En la Figuras 49 y 50 se presentan los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  del Compuesto I para *peroxidasa de rábano blanco*<sup>145</sup> y para el complejo [tetrakis-(2,6-diclorofenil)-porfinato-Fe(III)](hidroxo),<sup>49</sup> en el que se observa una señal relativamente fina entre 14 y 17 ppm. El cambio de desplazamientos químicos es notorio pues el espectro de RMN de la enzima en reposo presenta las señales de los cuatro metilos-hemo en 90 ppm y del complejo > 100 ppm.

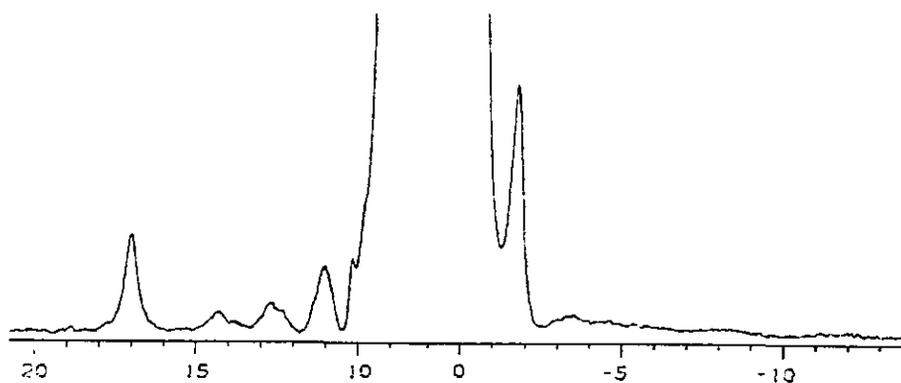


Figura 49. Espectro de RMN de protón de  $d_6$ -diacetildeutero del Compuesto I de *peroxidasa de rábano blanco*.<sup>145</sup>

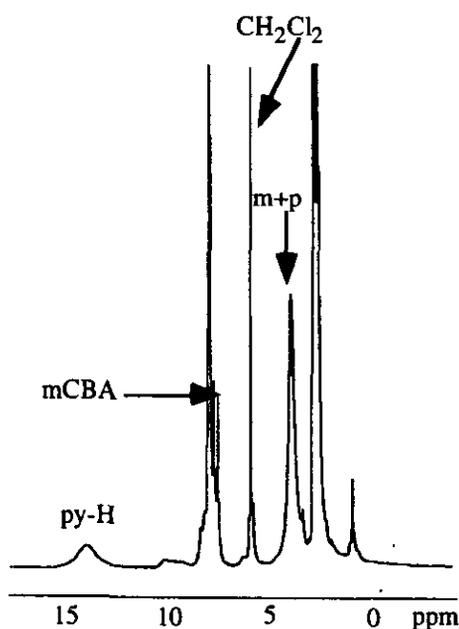


Figura 50. Espectro de RMN de protón para el producto de la oxidación del complejo [tetrakis(2,5-diclorofenil)porfinato-Fe(III)]hidroxo.<sup>49</sup>

La oxidación del complejo [(hidroxo)(tetrakis(2,6-diclorofenil)porfirinato)hierro(III)] a  $-50^{\circ}\text{C}$  da resonancias anchas en 14.1 y 4.01 ppm que fueron asignado a los protones- $\beta$  de los pirroles, sobre la base de su integral y de su comportamiento Curie, puesto que extrapolando a temperatura infinita se obtiene un desplazamiento de 10 ppm que se acerca a los desplazamientos de los protones- $\beta$  diamagnéticos de los pirroles.<sup>49</sup>

Para la espectroscopía de RPE se constatan señales  $g = 4.47$  (máximo), una que aparece más constantemente con una  $g = 3.71-3.5$ ; la tercera con  $g = 1.98-1.99$ . Una de las publicaciones relativa a estos intermediarios<sup>146</sup> presenta los espectros de RPE y de RMN de  $^1\text{H}$

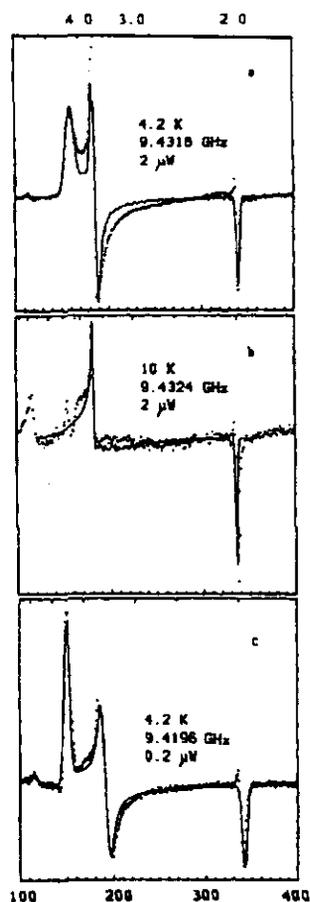


Figura 51. Espectros de tres compuestos modelo de peroxidasa oxidada reportados por Mandon y colaboradores.<sup>50</sup>

de los complejos de hierroporfirinas oxidados. En el espectro de RPE se observan dos

poblaciones, la primera con señales con  $g_x$  y  $g_y$  características del complejo oxidado. La otra señal marcada con un asterisco debida a la especie Fe(III) alto espín residual, que también contribuye a la señal en  $g = 2$ .

En la Figura 51 se observan los espectros de RPE de una serie de complejos modelos de peroxidasas oxidados con ácido m-cloroperbenzóico en los cuales las señales con  $g = 4$  y  $2$  son de espín cuarteto y confirman que el hierro ( $S=1$ ) del ferrilo está acoplado ferromagnéticamente al radical porfirínico.<sup>50</sup>

#### *IV.2 Instrumentos, materiales y condiciones*

Los espectros de RMN de protón se obtuvieron en un espectrómetro Varian UNITY300 a temperatura ambiente, utilizando una amplitud de campo de -80 a +80 ppm. La temperatura fue de -60 °C. La espectroscopía de RPE se hizo en un espectrómetro Jeol modelo JES-RE3X, se utilizó banda X de microfrecuencia (aproximadamente 9.08 GHz) a la temperatura de nitrógeno líquido, en una amplitud de campo de 0-500 mT.

Todas las espectroscopías de las reacciones se hicieron en disoluciones de metanol absoluto de los complejos de protoporfirina-Fe(III)-picdien, mesoporfirina-Fe(III)-picdien y deuteroporfirina-Fe(III)-picdien, a las que se les adicionaron 0.5 equivalentes de una disolución acuosa 0.1M de peróxido de hidrógeno.

#### IV. 3 Datos de resonancia magnética nuclear de $^1\text{H}$ . Discusión y conclusiones.

En la Tabla 26 se presentan los datos de los desplazamientos químicos de RMN de protón que se observaron cuando a los complejos porfirinas-hierro(III)-picdien 5-7 con mezcla cuántica de estados de espín 3/2, 5/2 se les hizo reaccionar con peróxido de hidrógeno. En la Figura 52 se presentan los correspondientes espectros.

Tabla 26. Datos de la espectroscopía de RMN de protón para los posible intermediarios Compuesto I o II de los complejos protoporfirina-Fe(III)-picdien 5, mesoporfirina-Fe(III)-picdien 6 y deuteroporfirina-Fe(III)-picdien 7 que se presentan en este trabajo

Complejo	$\delta_1$	$\delta_2$	$\delta_3$	$\delta_4$	$\delta_5$	$\delta_6$
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
protoporfirina-Fe(III)-picdien 5	39.04	38.91	-	-	7.11	3.4
mesoporfirina-Fe(III)-picdien 6	29.26		-	-	7.01	3.38
deuteroporfirina-Fe(III)-picdien 7	22.66	21.30	19.02	16.75	7.06	3.37

El disolvente fue metanol absoluto. La temperatura fue de  $-60^\circ\text{C}$

Observando los datos que corresponden a los complejos *porfirinas-pinza* estudiados en este trabajo, se puede observar un cambio en su estructura, lo que se refleja claramente en su comportamiento magnético, cuando se les adicionó el peróxido de hidrógeno (Tabla 26). Obviamente se esperaba este comportamiento, puesto que estos complejos presentaron una actividad considerable y por lo tanto deben formar los intermediarios propuestos o la mezcla de ellos.

En los espectros de RMN de protón de otros complejos reportados de hierroporfirinas oxidados es común encontrar las resonancias correspondientes a los protones- $\beta$  de los pirroles porfirínicos en las regiones apropiadas de 13 ppm. El disolvente utilizado durante las mediciones espectroscópicas de este tipo de compuestos es muy importante, ya que puede alargar un poco más el tiempo de vida media del intermediario.

Es claro que los desplazamientos que se observan para estos complejos están acordes

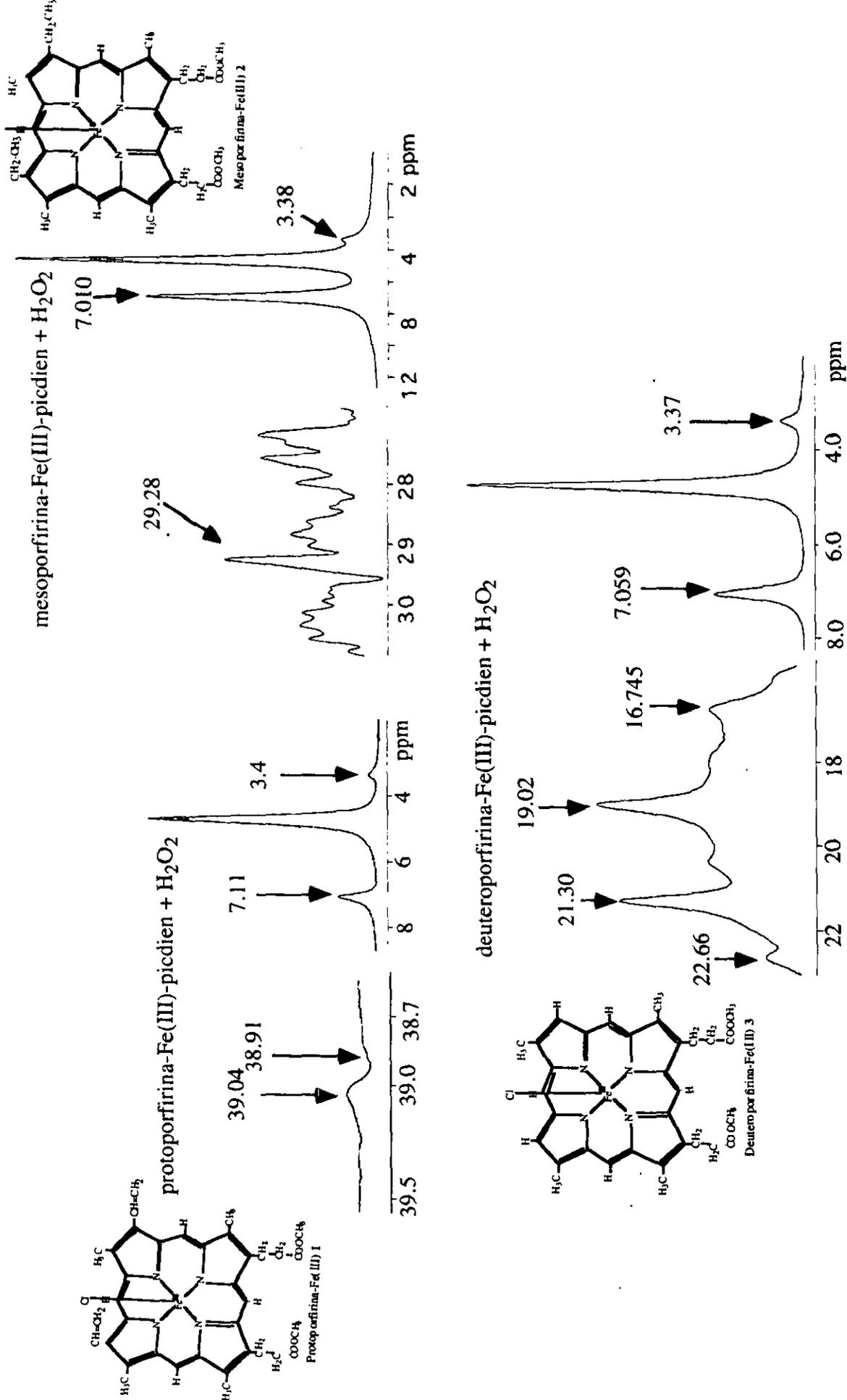


Figura 52. Espectros de RMN de protón de 300 MHz. de los complejos protoporfirina-Fe(III)-picdien 5, mesoporfirina-Fe(III)-picdien 7 y deuterioporfirina-Fe(III)-picdien 7, oxidados.

con lo reportado para los complejos intermediarios oxidados con peróxidos. El espectro que corresponde al complejo de [deuteroporfirina-Fe=Opicdien]<sup>+</sup> de hecho pone de manifiesto la presencia de los protones 2,4 característicos de esta porfirina.

En los tres espectros de RMN de las porfirinas-pinza se evidencia que el espín del nuevo compuesto formado es menor que el de partida y que la interacción de Fermi disminuye <sup>97.98</sup> notablemente al mismo tiempo que la transferencia de espín- $\sigma$  hacia los pirroles se minimiza por el movimiento de densidad electrónica hacia el hierro(IV) para su estabilización.

#### IV.4 Datos de resonancia paramagnética electrónica. Discusión y conclusiones.

En la Tabla 27 se presentan los datos de la espectroscopía de RPE de los productos de oxidación de los complejos protoporfirina-Fe(III)-picdien **5**, mesoporfirina-Fe(III)-picdien **6** y deuteroporfirina-Fe(III)-picdien **7**, cada uno con peróxido de hidrógeno. Es necesario mencionar que comparando los datos de los espectros de los complejos porfirinas-pinza sin peróxido, las señales se separan. Así, las señales con  $g_{\parallel}$  se mueven hacia 6, y las de  $g_{\perp}$  se desplazan ligeramente hacia  $g < 2.0023$  y con una traza de radical libre. Los espectros correspondientes se muestran en la Figura 53. En ellos se observa que la señal de  $g = 4$  se intensificó notablemente y es una señal que se observa en los espectros de otros modelos de radical ferrilo (Figura 51).

Tabla 27 Datos de las espectroscopías de RPE para los complejos oxidados de protoporfirina-Fe(III)-picdien **5**, mesoporfirina-Fe(III)-picdien **6** y deuteroporfirina-Fe(III)-picdien **7** que se estudiaron en este trabajo.

Complejo	$g_1$	$g_2$	$g_3$
[(protoporfirina-Fe <sup>IV</sup> =O)(picdien)] <sup>+</sup> <b>5</b>	5.8831	4.0327	1.9297
[(mesoporfirina-Fe <sup>IV</sup> =O)(picdien)] <sup>+</sup> <b>6</b>	5.7381	3.9691	1.9315
[(deuteroporfirina-Fe <sup>IV</sup> =O)(picdien)] <sup>+</sup> <b>7</b>	6.1878	4.0957	1.9500

Cuando a los complejos de protoporfirina-Fe(III)-picdien, mesoporfirina-Fe(III)-picdien y deuteroporfirina-Fe(III)-picdien se les agregó peróxido de hidrógeno y se les observó a través de la espectroscopía de EPR (Figura 51), se obtuvieron espectros distintos a los de los precursores porfirinas-pinza. La señal axial con  $g_s$  entre 5.17 y 5.22 de los complejos precursores y que corresponde a la población con hierro(III) alto espín pasó a EPR silencioso (Figuras 23b, 24b y 25b). Aparecen, sin embargo, señales axiales con  $g_s$  alrededor de 6 que corresponden a una especie de alto espín puro. Esta señal no es muy intensa. Algo que es

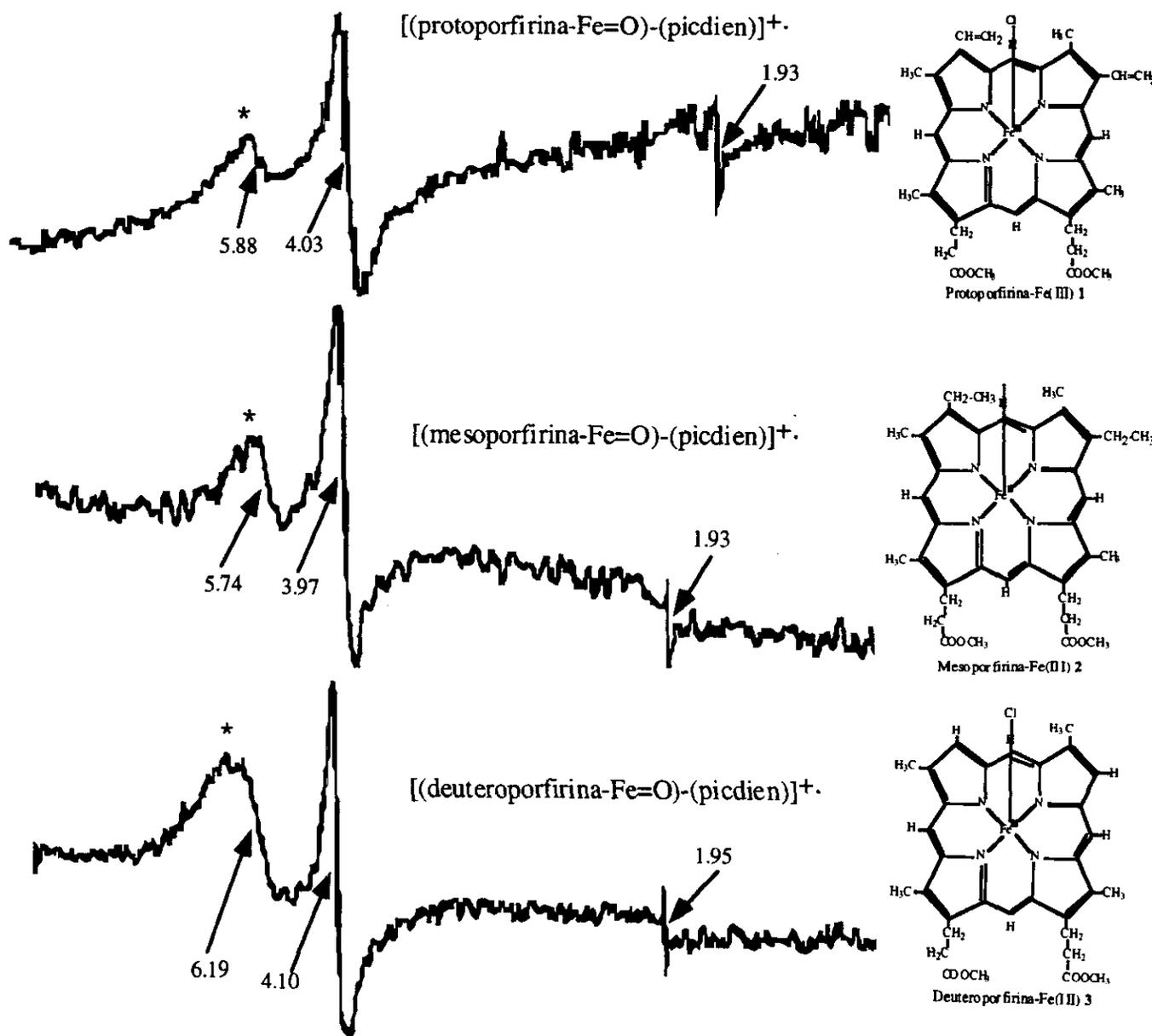


Figura 53. Espectros de RPE de los productos de reacción entre el peróxido de hidrógeno y los complejo protoporfirina-Fe(III)-picdien 5, mesoporfirina-Fe(III)-picdien 6 y deuteroporfirina-Fe(III)-picdien 7 preparados en este trabajo.

verdaderamente notable son las señales con  $g_s \sim 4$  que son totalmente diferentes en forma e intensidad a las de los precursores. Esta señal va acompañada con una muy pequeña en la zona del electrón libre ( $g \sim 2$ ) en los espectros de EPR de otros complejos reportados por otros investigadores<sup>42,136</sup> (Figura 53) que no se observa en los espectros de EPR que se están reportando en esta investigación. La intensidad de esta señal con respecto a la señal rómbica

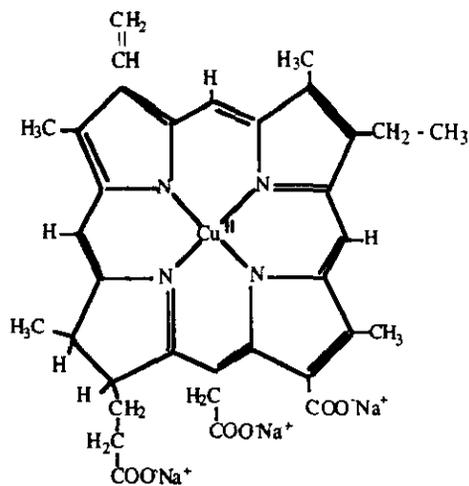
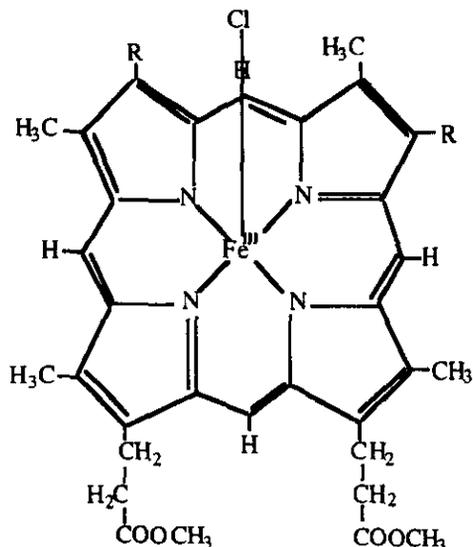
de los espectros de EPR de los precursores ( $B_5$ ,  $B_6$  y  $B_7$ ) aumenta de  $7 > 6 > 5$ . Por último, en la zona de  $g = 2$  los espectros de EPR de los complejos oxidados de 5-7, presentan señales característica de radical libre.

Con esos espectros de RPE de la Figura 53 se puede sostener la presencia de una especie con hierro(III) alto espín  $5/2$ .<sup>108,109</sup> Se descarta, por otro lado, la presencia de una especie con  $S = 1/2$  que podría corresponder a un hierro (III) bajo espín que en ese caso tendría que ser anisotrópico con esas tres señales, pero con valores de  $g$  entre 3-1.95.<sup>107,108</sup> Se puede pensar en la presencia de otra especie con un hierro(IV) y radical, con una señal en  $g = 4$  típica de ferrilo.<sup>42,130,132</sup> La señal en  $g < 2$  es de radical libre desplazada hacia campos más bajos por la gran deslocalización del electrón en la macroestructura conjugada.

Las observaciones por espectroscopías de RMN de protón y por RPE de los productos de las reacciones entre los complejos de porfirinas-Fe(III)-picdien con peróxido de hidrógeno indican que efectivamente el peróxido interacciona con el complejo para dar algún o algunos productos de reacción diferentes a la materia prima.

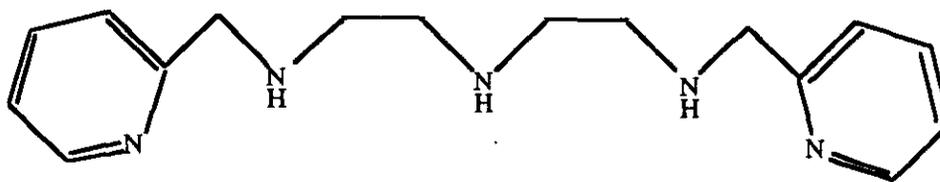
En la espectroscopía de RMN de protón los desplazamientos químicos en bajas frecuencias ponen en evidencia un cambio importante en el espín, que tiene como consecuencia una disminución en la interacción de contacto de Fermi. Sin embargo, de acuerdo a los reportes de otras investigaciones sobre la formación de los intermediarios Compuestos I y II, pudieran quedar los resultados presentes dentro de los característicos para estos intermediarios o para los complejos  $\mu$ -oxo o  $\mu$ -peroxo.<sup>42</sup>

-Se sintetizaron cuatro nuevos complejos de metaloporfirinas: protoporfirina-Fe(III)-picdien **5**, mesoporfirina-Fe(III)-picdien **6**, deuteroporfirina-Fe(III)-picdien **7** y clorina-Cu(II)-picdien **8**.



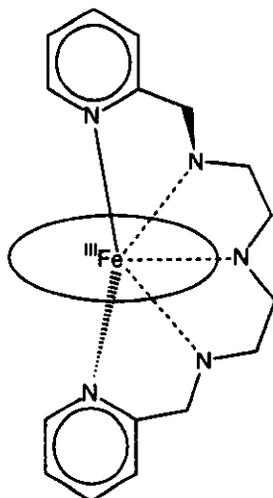
R = CH = CH<sub>2</sub>, cloruro de protoporfirina IX-hierro(III) éster dimetilico **1**.  
 R = CH<sub>2</sub> - CH<sub>3</sub>, cloruro de mesoporfirina IX-hierro(III) éster dimetilico **2**.  
 R = H; cloruro de deuteroporfirina IX-hierro(III) éster dimetilico **3**.

Clorina-Cu(II) (clorofilina) **4**



1,9-bis(2'-piridil)-2, 5, 8-triazanonano (picdien)

-Con base en los estudios espectroscópicos (UV-Vis, DCM, RMN de protón, RPE) y cinéticos (actividad de peroxidasa), se propone que el ligante picdien [1,9-bis(2'-piridil)-2,5,8-triazanonano] se coordina axialmente en las posiciones 5a. y 6a. de la porfirina. Como este tipo de estructura propuesta, con estas características espectroscópicas y cinéticas no había sido reportada en la literatura química especializada, se le denominó en este trabajo como familia de *porfirinas-pinza*..



-Las características espectroscópicas generales (UV-Vis, DCM, RMN de protón y EPR) de los complejos **5-7** muestran principalmente dos especies magnéticas de porfirinas-hierro(III): con estado de alto espín puro  $5/2$ , con estado de bajo espín puro  $1/2$  y con mezcla cuántica de estados de espín  $3/2$ ,  $5/2$ . Para el complejo **5** la dos especies con mezcla cuántica de estados de espín  $3/2$ ,  $5/2$  tienen la más baja participación del estado de alto espín  $5/2$ . En cambio para el complejo **6** se observa en la mezcla un porcentaje más alto de estado de espín. Para el complejo **7**, por el contrario, se propone la existencia de especies de alto y bajo espines puros con una mínima participación del espín  $3/2$  en la población con mezcla cuántica de estados de espín  $5/2$ ,  $3/2$ . Por lo tanto, la presencia del estado de espín  $5/2$  en las dos poblaciones con mezcla cuántica de estados de espín,  $5/2$ ,  $3/2$ , tiene el siguiente comportamiento  $5 > 6 > 7$ .

-Los complejos de(III)-picdien **5-7** presentaron una actividad catalítica como peroxidasa cuando se les hizo la prueba del guayacol. La clorina-Cu(II)-picdien **8** no la presentó, como se esperaba. Las constantes de velocidad máxima teórica,  $k_{cat}$ , que presentaron los complejos **5-7** resultó ser de  $10^4$ - $10^2$  veces menor que la reportada para la peroxidasa de *rábano blanco*. El orden de esa actividad como peroxidasa que presentaron las porfirinas-pinza fue  $5 > 6 > 7$ , que coincide con el comportamiento de menor participación del estado  $5/2$  en el  $3/2$ , de las poblaciones que tienen mezcla cuántica de estados de espín  $5/2$ ,  $3/2$ .

-El estudio colateral de la porfirina de Cu(II) dió información muy valiosa acerca del efecto que el ligante axial picdien tiene sobre la clorina-Cu(II) libre de él. Especialmente las espectroscopías de UV-Vis y EPR permitieron calcular los valores de los coeficientes de los orbitales moleculares y los niveles de energía de los mismos. Los resultados son cercanos a otros obtenidos en estudios hechos por otros grupos de investigación, de complejos semejantes. Esta información muestra un complejo hexa-coordinado (con seis átomos de nitrógeno ) octaédrico de clorina-Cu(II)-picdien **8** con una estructura electrónica, magnética y molecular diferente de la de su precursor **4**, aún cuando perteneciendo al grupo de simetría molecular  $D_{2h}$ . La coordinación del picdien a la clorina-Cu(II) le induce un cambio en la estructura electrónica. Sin embargo, se pudo cuantificar el grado de distorsión del macrociclo con picdien y sin picdien, y la conclusión es que no varía notablemente con la coordinación del picdien. Es posible concluir que las diferencias electrónicas, magnéticas y moleculares del compuesto **8** con respecto a su precursor **4**, no están relacionadas con el grado de distorsión del anillo clorínico. Estas diferencias se deben únicamente a la coordinación de los nitrógenos de los piridilos de la cadena del picdien.

-Los efectos de la distorsión geométrica y la configuración electrónica se pueden separar de acuerdo a los resultados de los valores de los coeficientes moleculares, de los diagramas de energía y de los factores de distorsión. Los datos indican una estructura suficientemente distorsionada por los sustituyentes periféricos que por lo tanto no es mayormente modificada por la coordinación del ligante axial picdien.

-Los nuevos complejos, **5-8**, de la nueva familia de modelos de peroxidasa porfirinas-pinza, son una aportación muy interesante al conocimiento de la química de coordinación de las metalo-porfirinas; al conocimiento de los efectos que los ligantes axiales tienen sobre el comportamiento magnético de estos compuesto, y que de acuerdo con Reed,<sup>6</sup> es valioso por su altísima sensibilidad y por su amplísima gama de posibilidades. La sistematización de estos estudios magnéticos lleva a crecer la lista de los elementos de la serie

magnetoquímica que el mismo Reed propone.<sup>6</sup>

El comportamiento magnético que presentaron los complejos **5-7**, con mezclas cuánticas de estados de espín  $5/2$ ,  $3/2$  para el ion férrico, resulto muy importante por la dificultad de tener los ligantes adecuados, tales que al coordinarse axialmente al Fe(III) de la porfirina induzcan una mezcla cuántica de estados de espín. De hecho, la serie magnetoquímica de Reed<sup>5</sup> contempla quince ligantes que se han reportado con estas cualidades. También se debe mencionar que los complejos preparados con esos ligantes que inducen en el Fe(III) estados de espín mezclados cuánticamente son penta-coordinados. Los estudios espectroscópicos de los nuevos complejos porfirinas-pinza llevan a proponer una estructura hexa-coordinadas de las porfirinas-Fe(III)-picdien.

-El otro aspecto muy valioso de la presente investigación, es sobre la excelente actividad como peroxidasa de los nuevos complejos porfirinas-pinza **5-7**, la cual es para el complejo protoporfirina-Fe(III)-picdien **5** muy cercana a la actividad reportada para la peroxidasa de *rábano blanco*. Ese comportamiento cinético fue fundamental para reducir el número de estructuras posibles propuestas para los complejos porfirinas-pinza, a la vez que la hexa-coordinación sería fundamental para la explicación de su excelente actividad catalítica como peroxidasa.

1. Stryer, L. *Biochemistry*, 3a. Ed., Freeman and Company, USA, 1988, p 518.
2. Kendrew, J.C.; Dickerson, P.E.; Strandberg, B.E.; Hart, R.G.; Davis, D.R.; Phillips, D.C.; Shore, V.C. *Nature*, 185 (1960) 422.
3. Ramírez-Rosales, D. *Resonancia Paramagnética Electrónica de Nuevos Transportadores Sintéticos de Oxígeno con Hierro*, Tesis de Maestría en Ciencias (Físicas), ESFM, IPN, 1995.
4. Gray, H.B.; Ellis, Jr., W.R. in *Bioinorganic Chemistry*; Bertini, I.; Gray, H.B.; Lippard, S.J.; Valentine, J.S., Ed.; University Science Books, USA, 1994, p 315.
5. Saunders, B.C.; Holmes-Sidle, A.G. *Peroxidase*, Butter Worths, EUA, 1964, 1
6. Reed, C.A.; Guiset, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3281.
7. Maltempo, M.M.; Moss, T.H.; Cusanovich, M.A. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *342*, 290.
8. Ozaki, S., Matsui, T.; Watanabe, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9784.
9. Maltempo, M.M.; Moss, T.H. *Q. Rev. Biophys.* **1976**, *9*, 181.
10. Zamorano Rafael, *El uso de la Resonancia Paramagnética Electrónica en la Caracterización de Complejos de Metales de Transición*, Coloquio **Técnicas Analíticas Importantes en Química Inorgánica**, Academia Mexicana de Química Inorgánica, A.C., CINVESTAV, diciembre de 1993.
11. Schulz, C.E.; Rutter, R.; Sage, J.T.; Debrunner, P.G.; Hager, L.P. *Biochem.* **1984**, *23*, 4743.
12. Bolscher, B.G.J.M.; Plat, H.; Wever, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *784*, 177.
13. Casella, L.; Gullotti, M.; Poli, S.; Ferrari, R.P.; Laurenti, E.; Marchesini, A. *BioMetals* **1993**, *6*, 213.
14. Poulos, T.L.; Freer, S.T.; Alden, R.A.; Edwards, S.L.; Skogland, U.; Takio, K.; Eriksson, B.; Xuong, N.; Yonetani, T.; Kraut, J. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 575.
15. Murthy, M.R.; Reid, T.J.; Sicignano, A.; Tanaka, N.; Rossmann, M.G. *J. Mol. Biol.* **1981**, *152*, 465.
16. Poulos, T.L.; Finzel, B.C.; Gunsalus, I.C.; Wagner, G.C.; Kraut, J.J. *Biol. Chem.* **1985**, *260*, 16122.
17. Poulos, T.L.; Edwards, S.L.; Wariishi, H.; Gold, M.H. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 4429.
18. Petersen, J.F.W.; Kadziola, A.; Larsen, S. *FEBS. Let.* **1994**, *339*, 291.
19. Traylor, T.G.; Hill, K.W.; Fann, W-P.; Tsuchiya, S.; Dunlap, B.E. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1308.

20. Groves, J.T.; Myers, R.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5791.
21. Traylor, T.G.; Tsuchiya, S.; Byun, Y-S.; Kim, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2775.
22. Traylor, T.G.; Iamamoto, Y.; Nakano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3529.
23. Traylor, T.G.; Marsters, Jr., J.C.; Nakano, T.; Dunlap, B.E. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5537.
24. Lindsay, S. J.R. in *Mtalloporphyrins in Catalytic Oxidations*; Sheldon, R.A. (Ed.); Merceel Dekker, Inc., EUA, 1994, p 325.
25. Kellin, D.; Mann, T. *Proc. Roy. Soc.* **1937**, *122*, 119.
26. Caldwell, E.S.; Steelink, C. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *184*, 420.
27. Brill, A.S.; Sandberg, H.E. *Biochem.* **1968**, *7*, 4254.
28. Zerner, M.; Gouterman, M.; Kobayashi, H. *Theoret. Chim. Acta* **1966**, *6*, 363.
29. Owens, J.W.; O'Connor, C.J. *Coord. Chem. Rev.* **1988**, *84*, 1.
30. La Mar, G.; Walker, A.F. in *The Porphyrins* Vol. 4; Dolphin, D., Ed.; Academic Press, New York, **1979**, 61.
31. Saterlee, J.D.; Erman, J.E. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 199.
32. Goff, H.M.; González-Vergara, E.; Bird, M.R. *Biochem.* **1985**, *24*, 1007.
33. Assa, R.; Vanngard, T.; Dunford, H.B. *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *391*, 259.
34. Reed, C.A.; Mashiko, T.; Bentley, S.P.; Kastner, M.E.; Scheidt, W.R.; Spartalian, K.; Lang, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 2948.
35. Hori, H.; Yonetani, T. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 349.
36. Goldbeck, R.A.; Tolf, B-R.; Wee, A.G.H.; Shu, A.Y.L.; Records, R.; Bunnenberg, E.; Djerassi, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6449.
37. Browett, W.R.; Gasyna, Z.; Stillman, M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *110*, 3633.
38. Andesson, L.A.; Bylkas, S.A.; Wilson, A.E? *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3406.
39. Eichhron, G.L.; Marzilli, L.G. *Hemoproteins* Vol. 7, Elsevier, New York, **1988**, 196.
40. English, A.M. *Iron: Heme Proteins, Peroxidases and Catalases*, Canada, **1994**, 168.
41. Finzel, B.C.; Poulos, T.L.; Kraut, J. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 13033.
42. Balch, A.L. *Inorg. Chim. Acta* **1992**, *198-200*, 297.

43. Dolphin., D. *Usrael J. Chem.* **1981**, *21*, 67.
44. Morishima, I.; Ogawa, S. *Biochem.* **1978**, *17*, 4384.
45. Sontum, S.F.; Case, D.A. *J. Am. Cham. Soc.* **1985**, *107*, 4013.
46. Rutter, R.; Hager, L.P.; Dhonau, H.; Hendrich, M.; Valentine, M.; Debrunner, P. *Biochem.* **1984**, *23*, 6809.
47. Chin, D.; Balch, A.L.; La Mar, G.N. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 1446.
48. Woo, F.S.; Rodríguez, R.E.; Huckaby, D.A.; Jones, P.; Kelly, H.C. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 1144.
49. Gold, A.; Jayaraj, K.; Doppelt, P.; Weiss, R.; Chottard, G.; Bill, E.; Ding, X.; Trawtwein, A.X. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5756.
50. Mandon, D.; Weiss, R.; Jayaraj, K.; Gold, A.; Ternner, J.; Bill, E.; Trutwein, A.X. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 4404.
51. George, P. *Biochem.* **1953**, *54*, 267
52. Ator, M.A.; Ortíz de Montellano, P.R. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 1542.
53. La Mar, G.N. *Biological Aplications of Magnetic Resonance*, Academic Press, Inc., EUA, **1979**, 312.
54. Woo, F.S.; Cahiwat-Alquiza, M.; Kelly, H.C. *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 4718.
55. Dawson, J.H. *Science* **1988**,*240*, 433.
56. de Ropp, J.S.; Thanabal, V.; La Mar, G.N.; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 8268.
57. Traylor, T.G.; Lee, W.A.; Stynes, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 755.
58. Traylor, T.G.; Popovitz-Biro, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 239.
59. Yamaguchi, K.; Watanabe, Y.; Morishima, I. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 156.
60. Traylor, T.G.; Kim, Ch.; Richards, J.L.; Xu, F.; Perrin, Ch.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3468.
61. Solomon, E.I.; Penfield, K.W.; Wilcox, D.E. in *Structure and Bonding* 53; Clarke, M.J.; Goodenough, J.B.; Hemmerich, P.; Ibers, J.A.; Jorgensen, C.K.; Neilands, J.B.; Reinen, D.; Weiss, R.; Williams, R.J.P., Ed.; Springer-Verlag, Germany, 1983, p 1.
62. Nonomura, Y.; Yoshioka, N.; Inoue, H. *Inorg. Chim. Acta* **1994**, *224* , 181.
63. Diekmann, H.; Chang, C.K.; Traylor, T.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *93* , 4068.
64. Baker, E.W.; Brookhart, M.S.; Corwin, A.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* , 4587.

65. Sakaguchi, U.; Addison, A.W. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1979**, 600.
66. Blaauwen, T.; Canters, G.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1121.
67. Aasa, R.; Malmstrom, B.G.; Saltman, P.; Vanngard, T. *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, *75*, 203.
68. Zong-Wan, M.; Qin-Wei, H.; Wen-Xia, T. *Polyhedron* **1996**, *15*, 321.
69. Theatle, F.W. *J. Biochim. Biophys. Acta* **1959**, *35*, 543.
70. Falk, A.D. in *The Porphyrins and Metalloporphyrins*; Smith, K.M., Ed.; Elsevier, New York, **1975**, 803.
71. Adler, A.D.; Ostfeld, D.L.; Abbott, E.H. *Bioinorg. Chem.* **1977**, *7*, 187.
72. Ahmed, E.; Chatterjee, C.; Coosey, C.J.; Tobe, M.L.; Williams, G. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1989**, 645.
73. Adar, F. *The Porphyrins*, Vol. III, Academic Press, New York, Inc., 1978, 167
74. Gouterman, M. in *The Porphyrins* Vol. III; Dolphin, D., Ed.; Academic Press, Inc., New York, **1978**, 167.
75. Dolphin, D.H.; Sams, J.R.; Tsin, T.B. *Inorg. Chem.* **1977**, *16*, 711.
76. Summerville, D.A.; Cohen, I.A.; Hatano, K.; Scheidt, W.R. *Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 2906.
77. Ogoshi, H.; Sugimoto, H.; Yoshida, Z. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *621*, 19.
78. Kobayashi, H.; Kaizu, Y.; Eguchi, K. *Adv. Chem. Ser.* **1980**, *No. 191*, 327.
79. Boersma, A.; Goff, H.M. *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 581.
80. Solomon, E.I.; Kirk, M.L.; Gamelin, D.R.; Pulver, S. *Methods in Enzymology* **1995**, *246*, 91.
81. Maltempo M.M.; Moss, T.H.; Cusanovich, M.A. *J. Chem. Phys.* **1974**, *61*, 2540.
82. Drago, R.S. *Physical Methods in Chemistry*, Saunders College Publishing, EUA, **1977**, 316.
83. Holmquist, B. *Methods in Enzymology* **1986**, *130*, 270.
84. Dawson, J.H.; Eble, K.S. in *Advances in Inorganic and Bioinorganic Mechanisms*; Sykes, A.G., Ed.; Vol. 4, Academic Press, Inc., USA, **1986**, 9.
85. Blumberg, W.E; Peisach, J.; Wittenberg, A.; Wittenberg, J.B. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 1854.

86. Dawson, J.H.; Dooley, D.M. in *Iron Porphyrins*; Lever, A.B.P.; Gray, H.B., Ed.; Parte III, VCH, USA, **1989**, 3.
87. Gupta, G.P.; Lang, G.; Lee, Y.J.; Scheidt, R.; Shelly, K.; Reed, C.A. *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 3022.
88. Ogoshi, H.; Sugimoto, H.; Yoshida, Z. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *621*, 19.
89. Olhausen, L.N.; Cockrum, D.; Register, J.; Roberts, K.; Long, G.J.; Powell, G.L.; Huitchinson, B.B. *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 4886.
90. Ookubo, S.; Nozawa, T.; Hatano, M. *J. Inorg. Biochem.* **1987**, *30*, 45.
91. Ookubo, S.; Nozawa, T.; Hatano, M. *J. Inorg. Biochem.* **1989**, *35*, 305.
92. Cheek, J.; Coulter, E.O.; Maritano, S.; Marchesini, A.; Dawson, J.H. *Inorg. Chim. Acta* **1996**, *234*, 317.
93. Cheesman, M.R., Greenwood, C., Thomson, A.J. in *Advances in Inorganic Chemistry*; Sykes, A.G., Ed.; Vol. 36, Academic Press, Inc., USA, **1991**, 201.
94. Vallee, B.L.; Holmquist, B. in *Methods for Determining Metal Ion Environments in Proteins. Structure and Function of Metalloproteins*; Darnall, D.W., Wilkins, R.P., Ed.; Elsevier North Holland, Inc., USA, **1978**, *27*, 214.
95. Sutherland, J.C. *Methods in Enzymology* **1995**, *246*, 110.
96. Dooley, D.M.; Dawson, J.H. *Coord. Chem. Rev.* **1984**, *60*, 1.
97. Dawson, J.H.; Khodayan, S.; Zhuorg, Ch.; Sono, M. *J. Inorg. Biochem.* **1992**, *45*, 179.
98. Holmquist, B. in *The Porphyrins; The Porphyrins*, Vol. III, Academic Press, New York, Inc., **1978**, 249.
99. Budd, D.L.; La Mar, G.N.; Langry, K.C.; Smith, K.M.; Nayyir-Mazhir, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6091.
100. Dugad, L.B.; Mitra, S. *Proc. Indian Acad. Sci (Chem. Sci.)* **1984**, *93*, 295.
101. Kurland, R.J.; Little, R.G.; Davis, D.G.; Ho, Ch. *Biochem.* **1971**, *12*, 2237.
102. Satterlee, J.D.; Erman, J.E. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 199.
103. Hill, H.A.O.; Morallee, K.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 731.
104. La Mar, G.N.; Viscio, D.B.; Smith, K.M.; Caughey, W.S.; Smith, M.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 8085.
105. Mazumdar, S.; Medhi, O.K.; Mitra, S. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 2541.
106. González-Vergara, E; Meyer, M.; Goff, H.M, *Biochem.* **1985**, *24*, 6561.

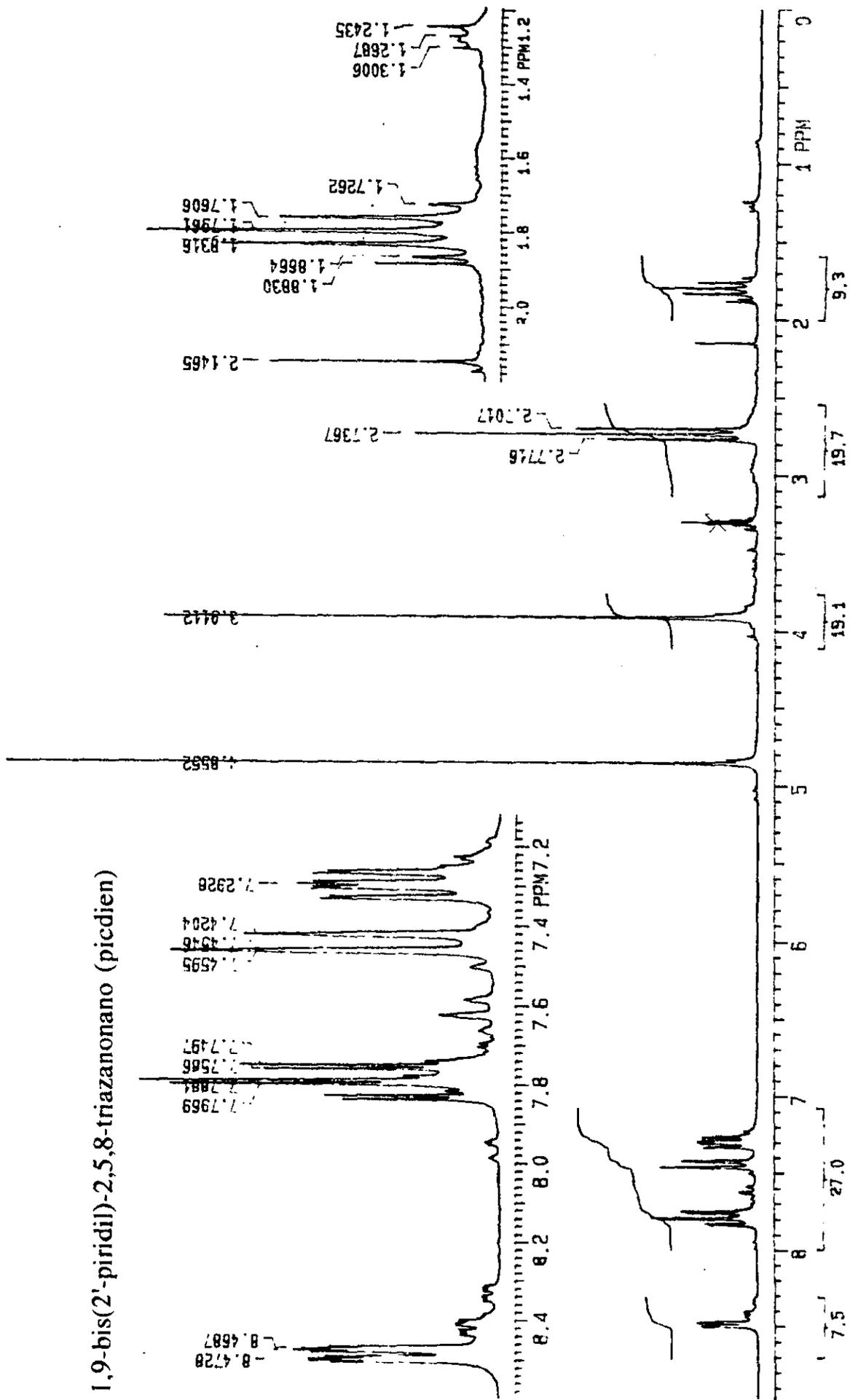
107. Lukat, G.S.; Rodgers, K.R.; Jabro, M.N.; Goff, H.M. *Biochem.* **1989**, 28, 3338.
108. Pilbrow, J.R.; Hanson, G.R. *Methods in Enzymology* **1993**, 227, 330-332.
109. Castner, Jr., T.; Newell, G.S.; Holton, W.C.; Slichter, C.P. *J. Chem. Phys.* **1960**, 32,
110. Dowsing, R.D.; Gibson, J.F. *J. Chem. Phys.* **1969**, 50, 294.
111. Cammack, R.; Cooper, Ch.E. *Methods in Enzymology* **1993**, 227, 352.  
668.
112. Palmer, G. in *Methods for Determining Metal Ion Environments in Proteins. Structure and Function of Metalloproteins*; Darnall, D.W., Wilkins, R.P, Ed.; Elsevier North Holland, Inc., USA, 27, 153.
113. Goff, H.M.; Shimomura, E.T.; Phillippi, M.A. *Inorg. Chem.* **1983**, 22, 66.
114. Lukat, G.S.; Rodgers, K.R.; Goff, H.M. *Biochem.* **1987**, 26, 6927.
115. Lukat, G.S.; Jabro, M.N.; Rodgers, K.R.; Goff, H.M. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, 954, 265
116. Momenteau, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, 304, 814.
117. F. Chávez-Rivas, R. Zamorano-Ulloa, D. Galland, F. Regnard, and J. Chappent *J. Appl. Phys.* **1991**, 70, 5849.
118. Scholz, W.E.; Reed, C.A.; Lee, Y.J.; Scheidt, W.R.; Lang, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 6791.
119. Athappan, Pr.; Rajagopal, G. *Polyhedron* **1996**, 15, 527.
120. Fajer, J. *Chemistry and Industry* December **1991**, 869.
121. Ravikanth, M.; Reddy, D.; Misra, A.; Chandrasherkar, T.K. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1993**, 1137.
122. Belford, R.L.; Maurice, A.M.; Nilges, M.J. *Pogram QPOW* 1980, ESR Analysis Software was Furnished by the Illinois ESR Research, Center, NIH Division of Research Resources Grant No. RR01811.
123. Basurto, E. *Simulación de Espectros de RPE de Compuestos Lantánidos*. Tesis de Maestria en Ciencias (Física), ESFM, IPN, enero de 1996.
124. Antosik, S.; Brown, N.M.D.; McConnell, A.A.; Porte, A.L. *J. Chem. Soc. (A)* **1969**, 545.
125. Gersmann, H.R.; Swalen, J.D. *J. Chem. Phys.*, **1962**, 36, 3221.
126. Kuska, H.A.; Regers, M.T.; Drullinger, R.E. *J. Phys. Chem.* **1967**, 71, 109.

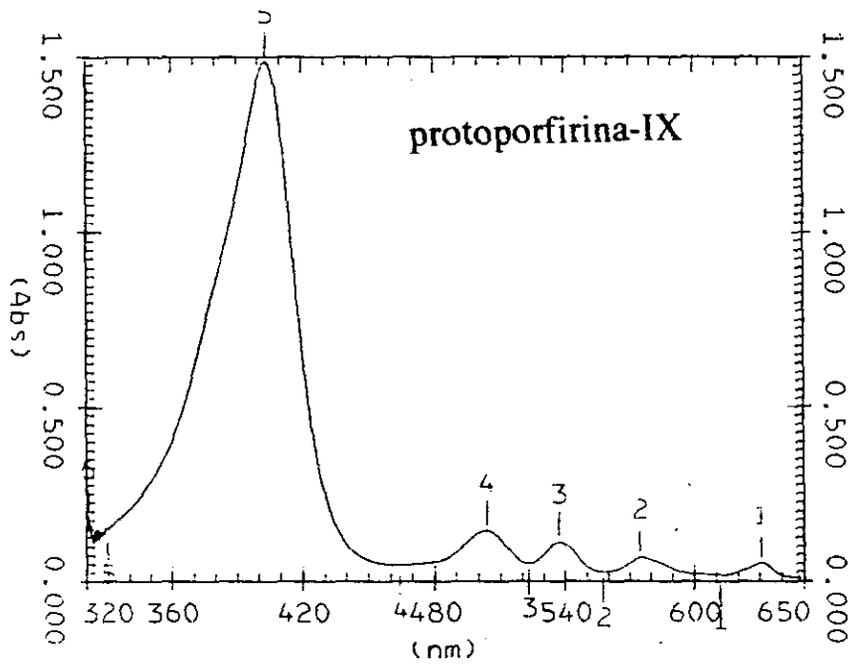
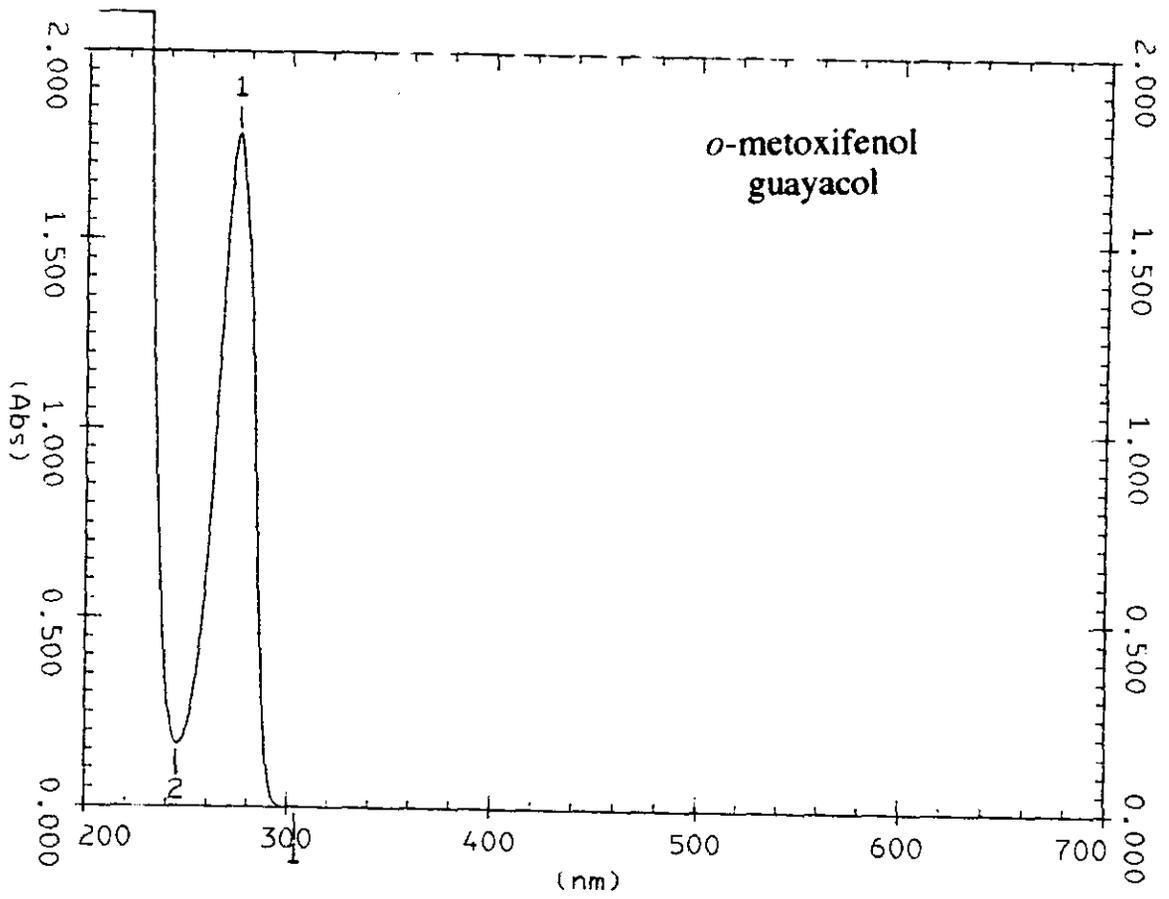
127. Johann Pulter en *Methods of Enzymatic Analysis*; Ulrich, H. (Ed.); Vol. II, Academic Press., USA, 1974, 685.
128. Adams, P.A. en *Peroxidases in Chemistry and Biology*; Everse, J.; Everse, K.E.; Grisham, M.B. (Ed.); Vo:II, CRC Press, USA, 1991, 171.
129. Rodríguez, R.E.; Woo, F.S.; Huckaby, D.A.; Kelly, H.C. *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 1434.
130. Meunier, B. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1411.
131. Groves, J.T.; Nemo, T.E. *J. Am. Chem Soc.* **1983**, *105*, 6243.
132. Traylor, P.S.; Dolphin, D.; Traylor, T.G. *J. Chem Soc., Chem. Commun.* **1984**, 279.
133. Gilbert, B.C.; Hodges, G.R.; Smith, L.I.R.; MacFaul, P.; Traylor, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1996**, *2*, 519.
134. Dolman, D.; Newell, G.A.; Thrulow, M.D.; Dunford. H.B. *Can. J. Biochem.* **1975**, *53*, 495.
135. Baek, H.K.; Van Wart, H.E. *Biochem.* **1989**, *28*, 5714.
136. Groves, J.T.; Watanabe, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8443.
137. Jones, P.; Mantle, D.; Wilson, I. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1983**, 161.
138. Baldwin, D.A.; Marques, H.M.; Pratt, J. *J. Inorg. Biochem.* **1987**, *30*, 203.
139. Day, R.A.; Underwood, A.L. *Química Analítica Cuantitativa*, Prentice Hall, México, **1989**, 9.
140. Dean, R.B.; Dixon, W.J. *Anal. Chem.* **1951**, *23*, 636.
141. Dolphin, D.; Felton, R.H. *Acc. Chem. Res.* **1994**, *7*, 26.
142. Jayaraj, K.; Turner, J.; Gold, A.; Roberts, D.A.; Austin, R.N.; Mandon, D.; Weiss, E.; Bill, E.; Muther, M.; Trautwein, A. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 1632.
143. La Mar, G.N.; de Ropp, J.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 395.
144. Morishima, I.; Ogawa, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 7125.
145. Latos-Grazynski, L.; Blach, A.L.; La Mar G.N. *Advances in Chemistry*; American Chemical Society: Washington, DC, 1982.
146. Gross, Z.; Nimiri, S. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 1731.  
*Trans.* **1989**, 645.
147. Fujii, H.; Yoshimura, T.; Kamada, H. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 2373.

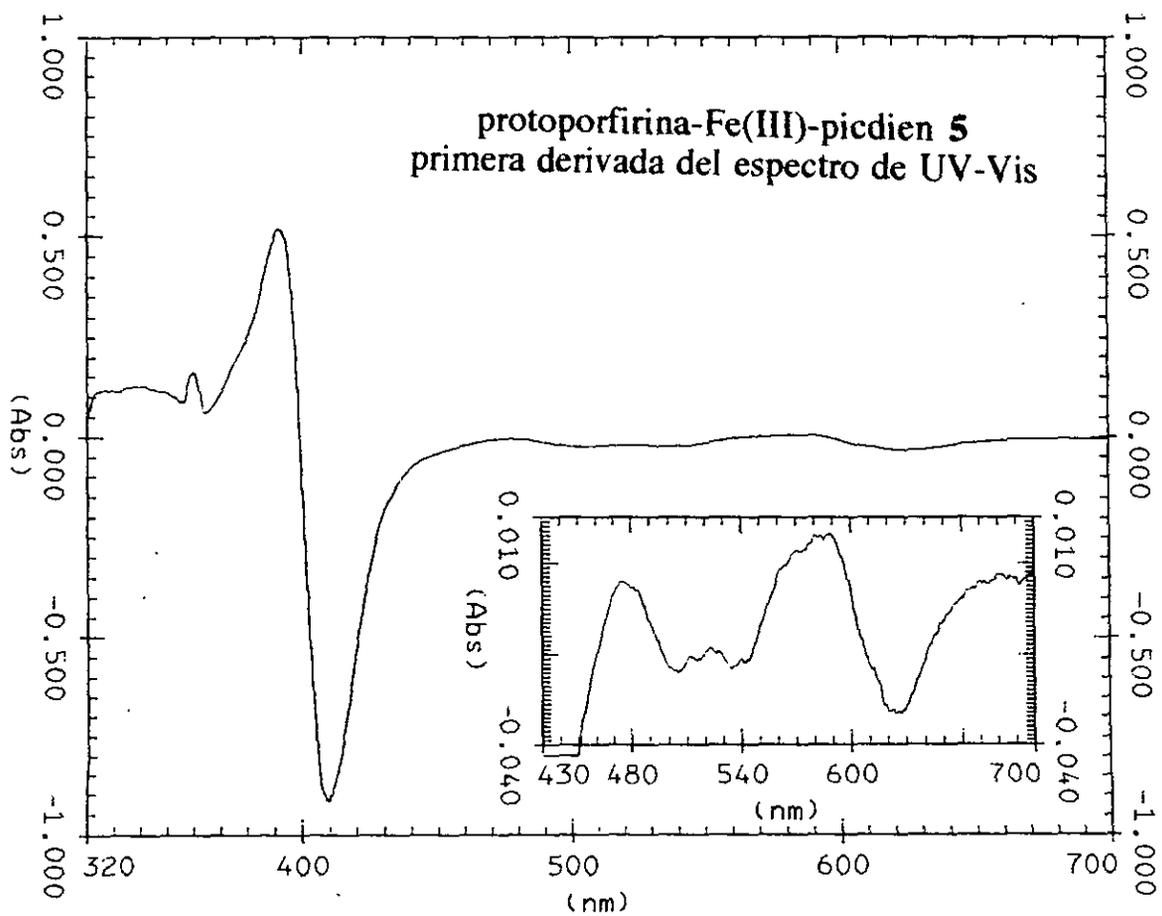
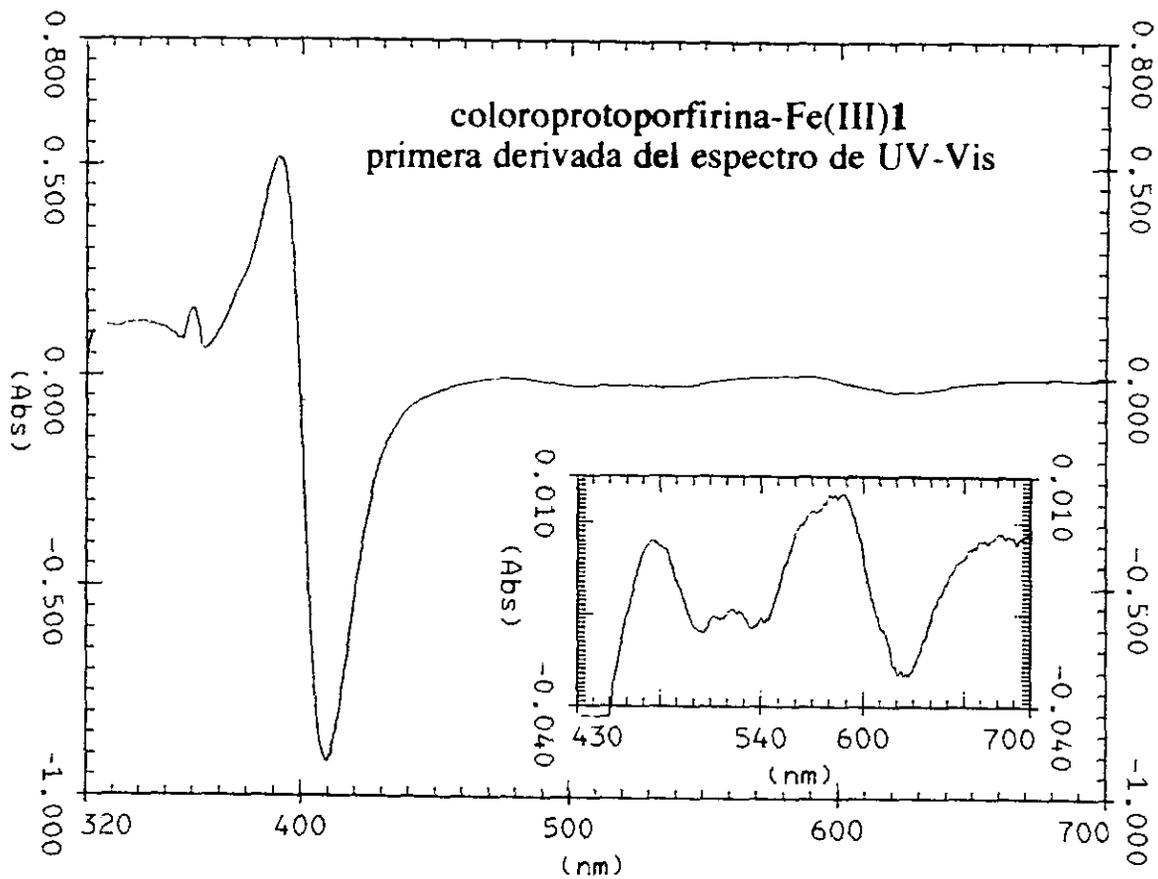
## Apéndices

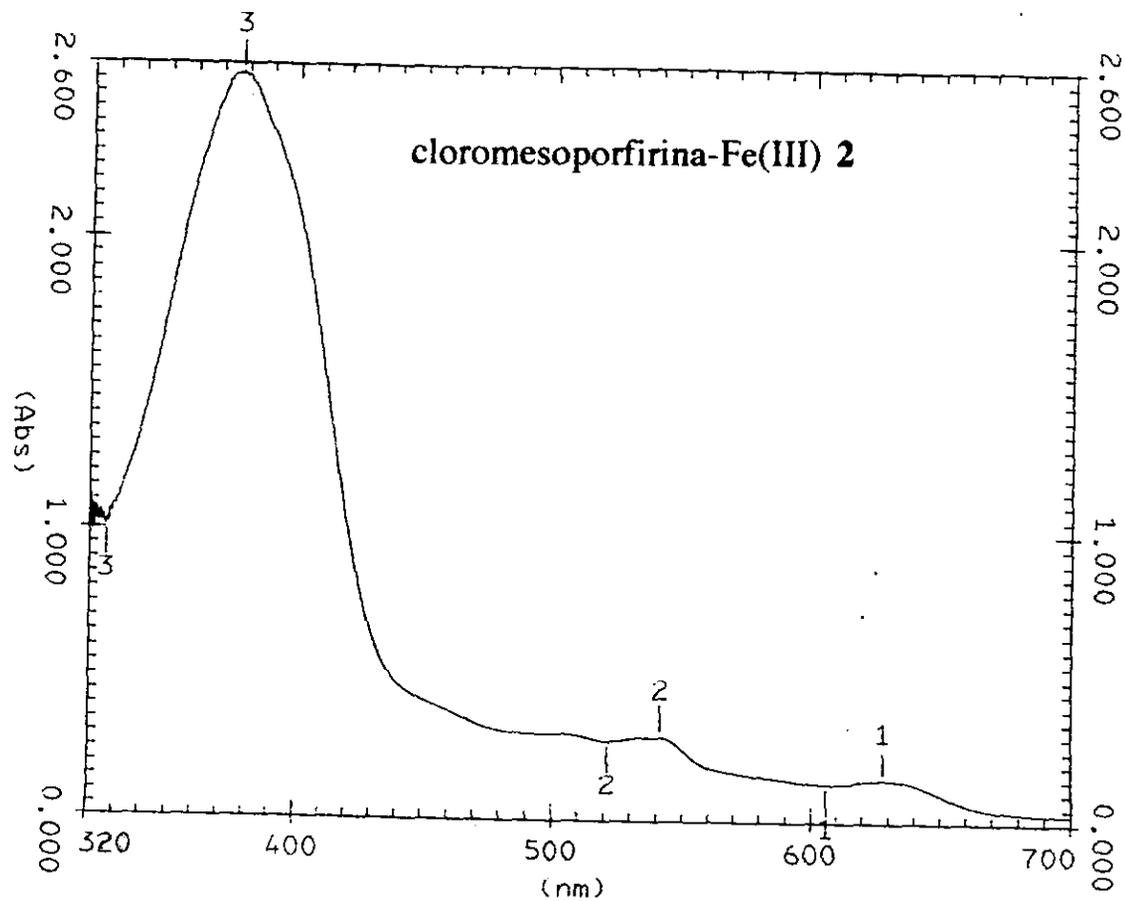
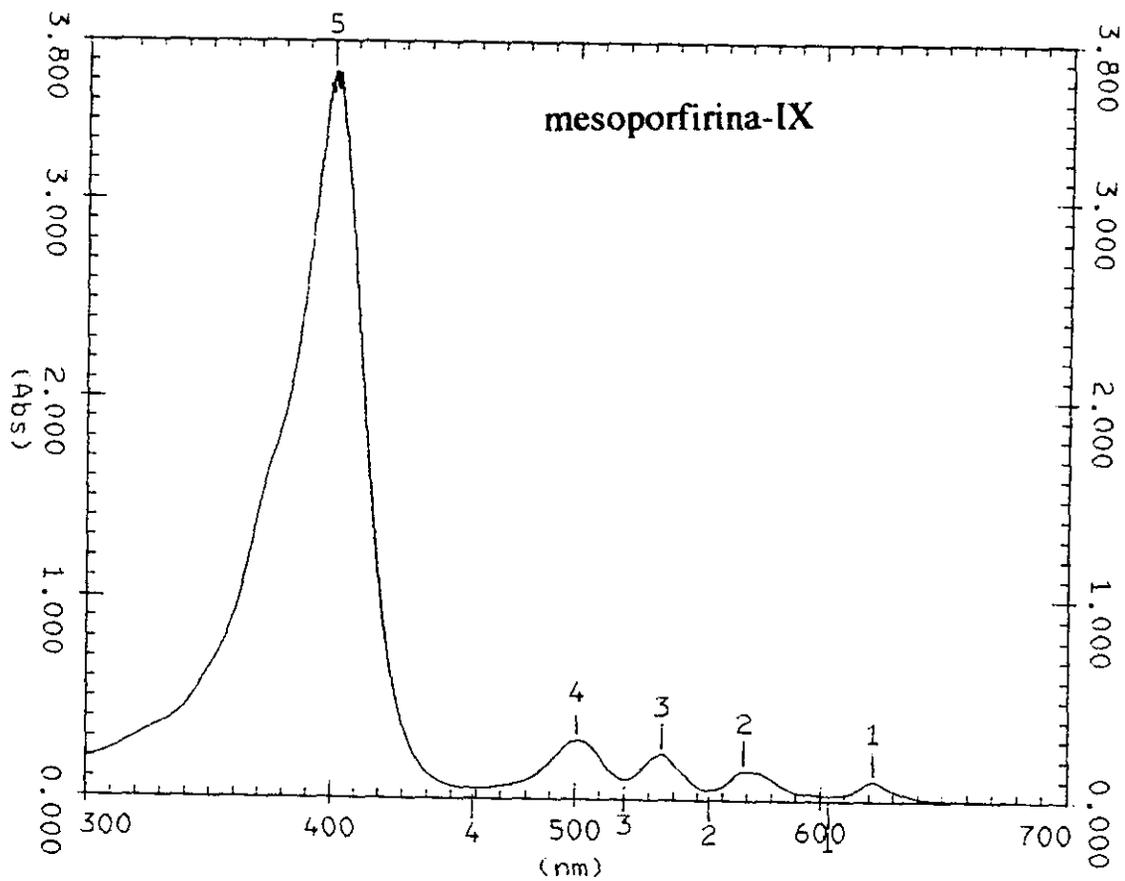
- 1 *Tablas y gráficas de cinéticas*
2. *Espectros de UV-Vis, RMN de protón, RPE, DCM*

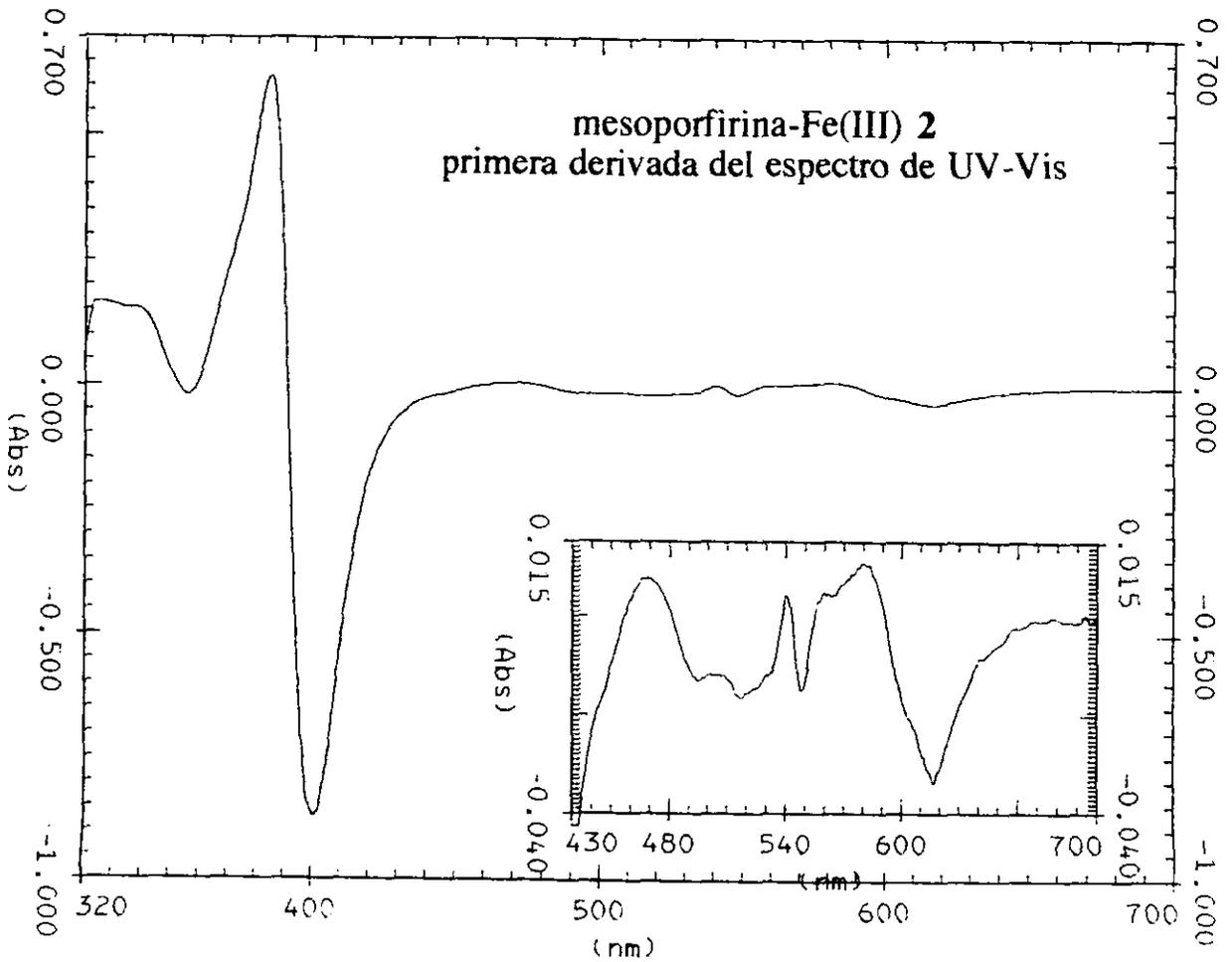
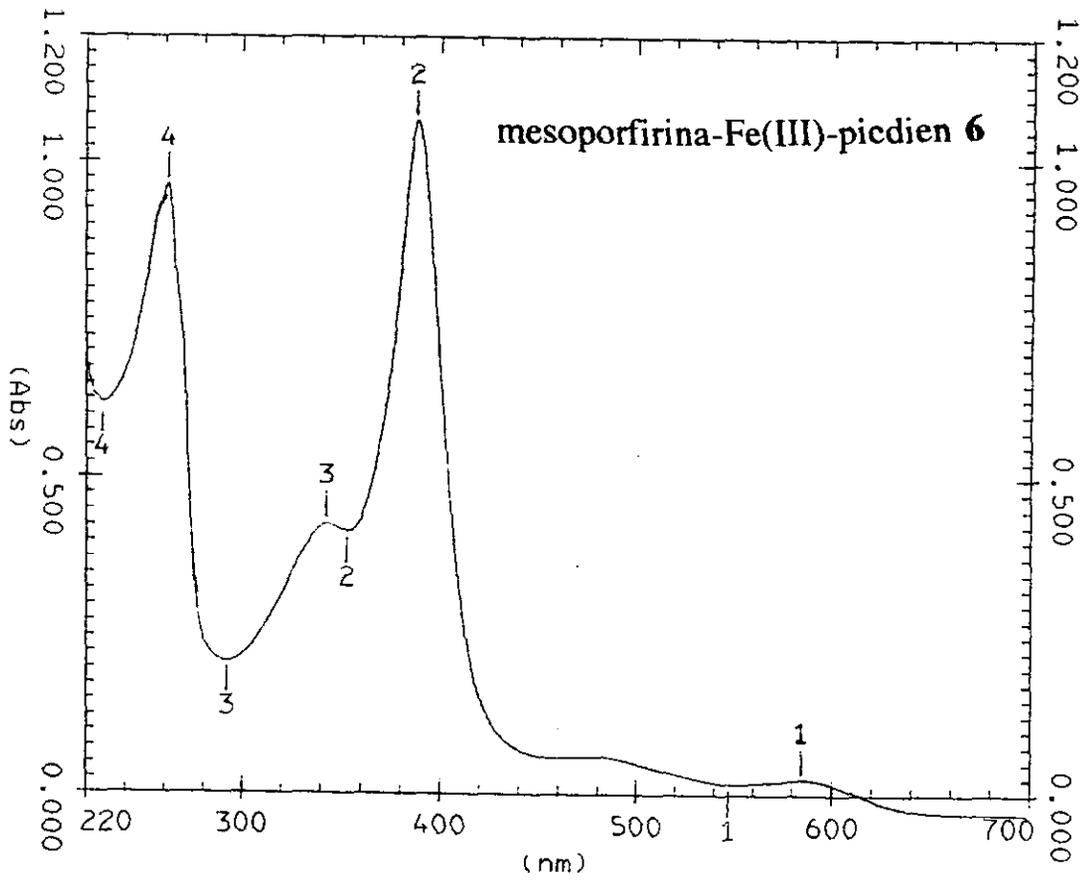
1,9-bis(2'-piridil)-2,5,8-triazanano (picdien)

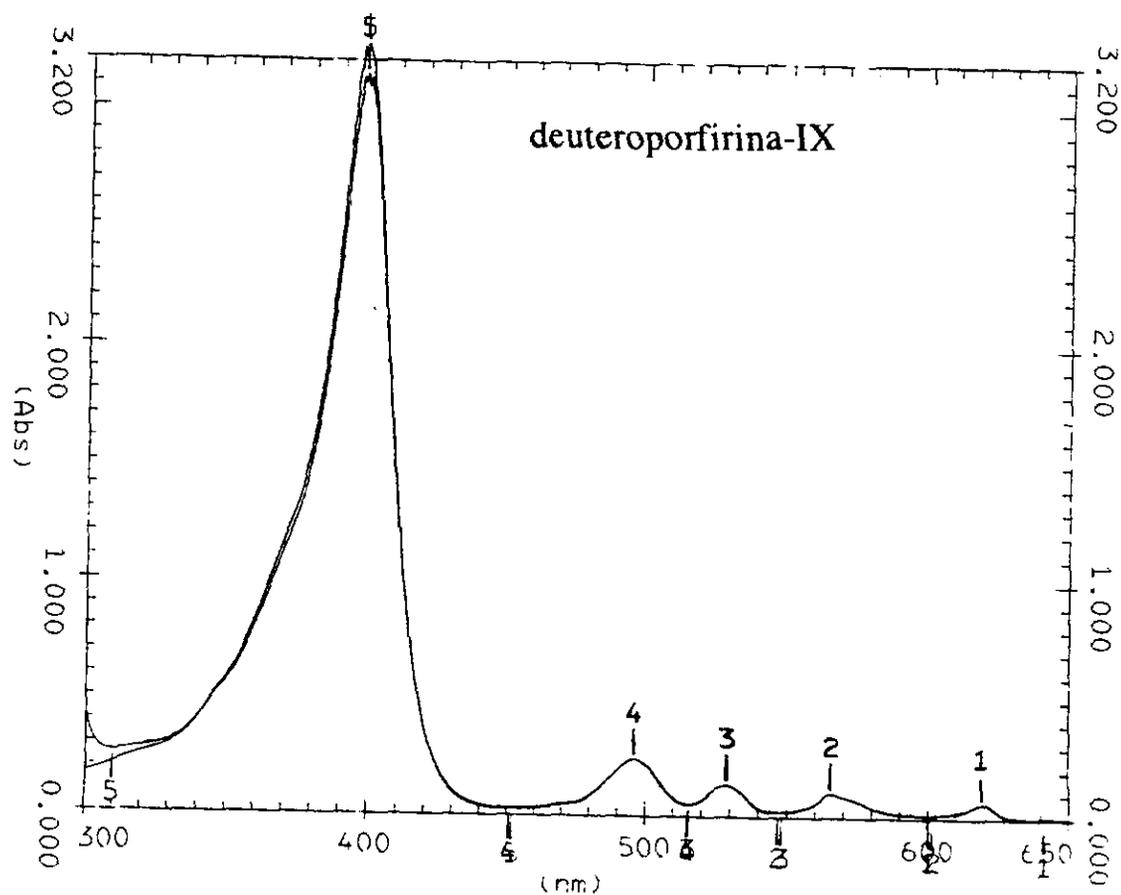
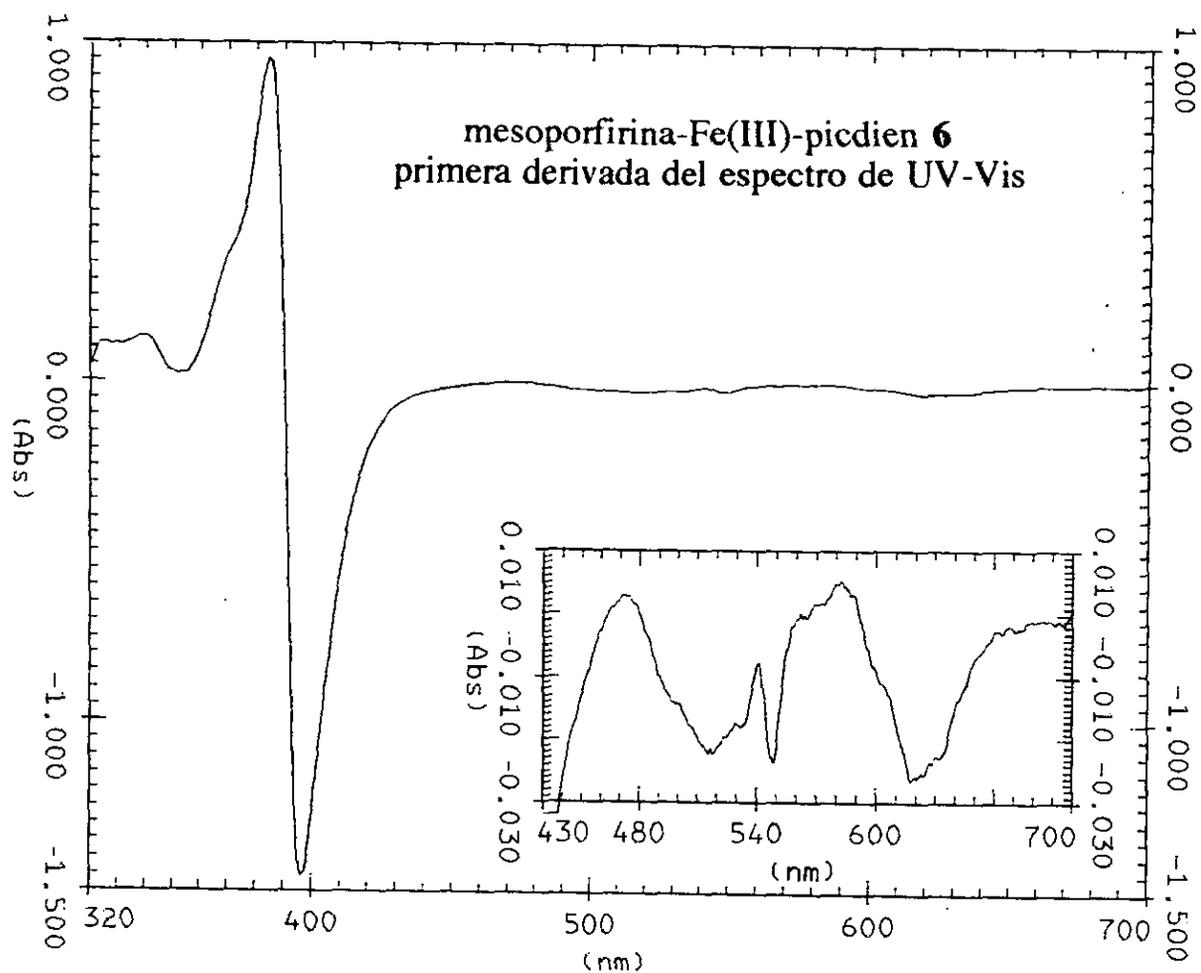


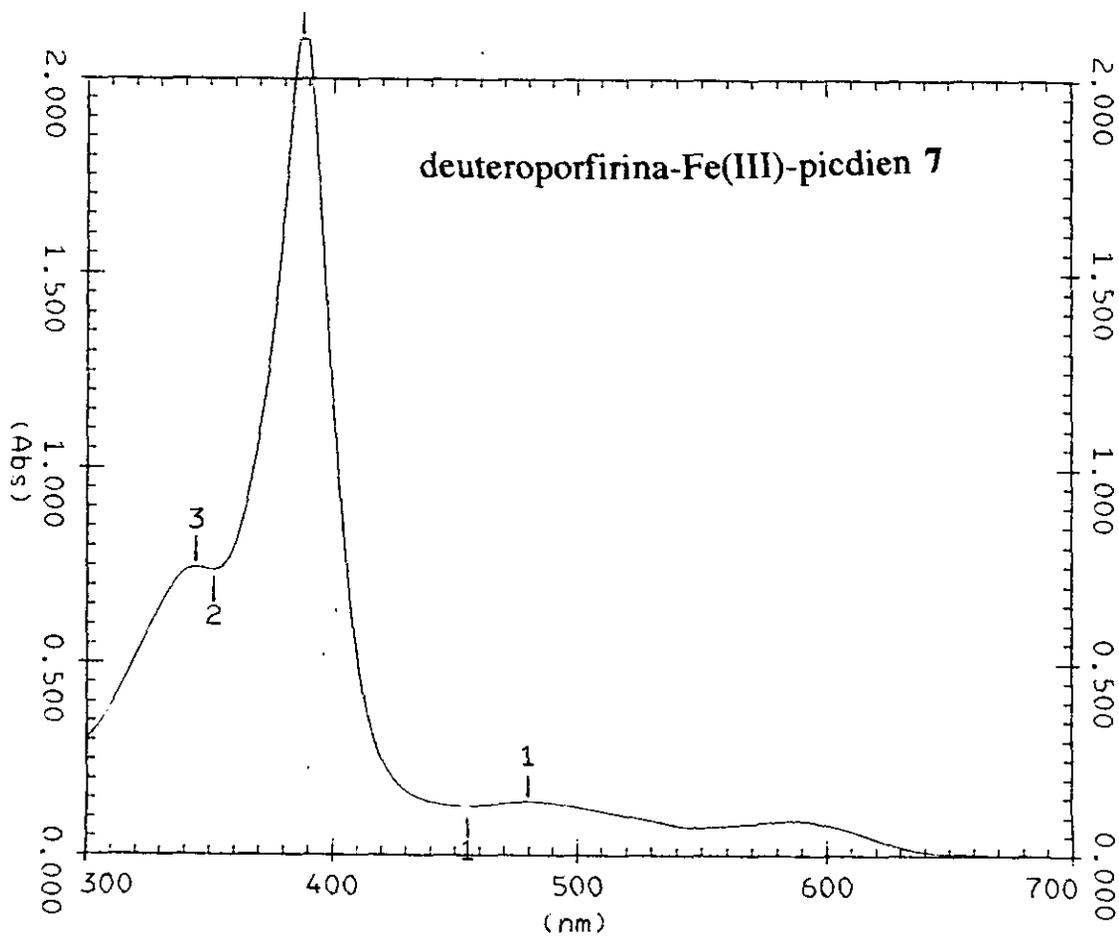
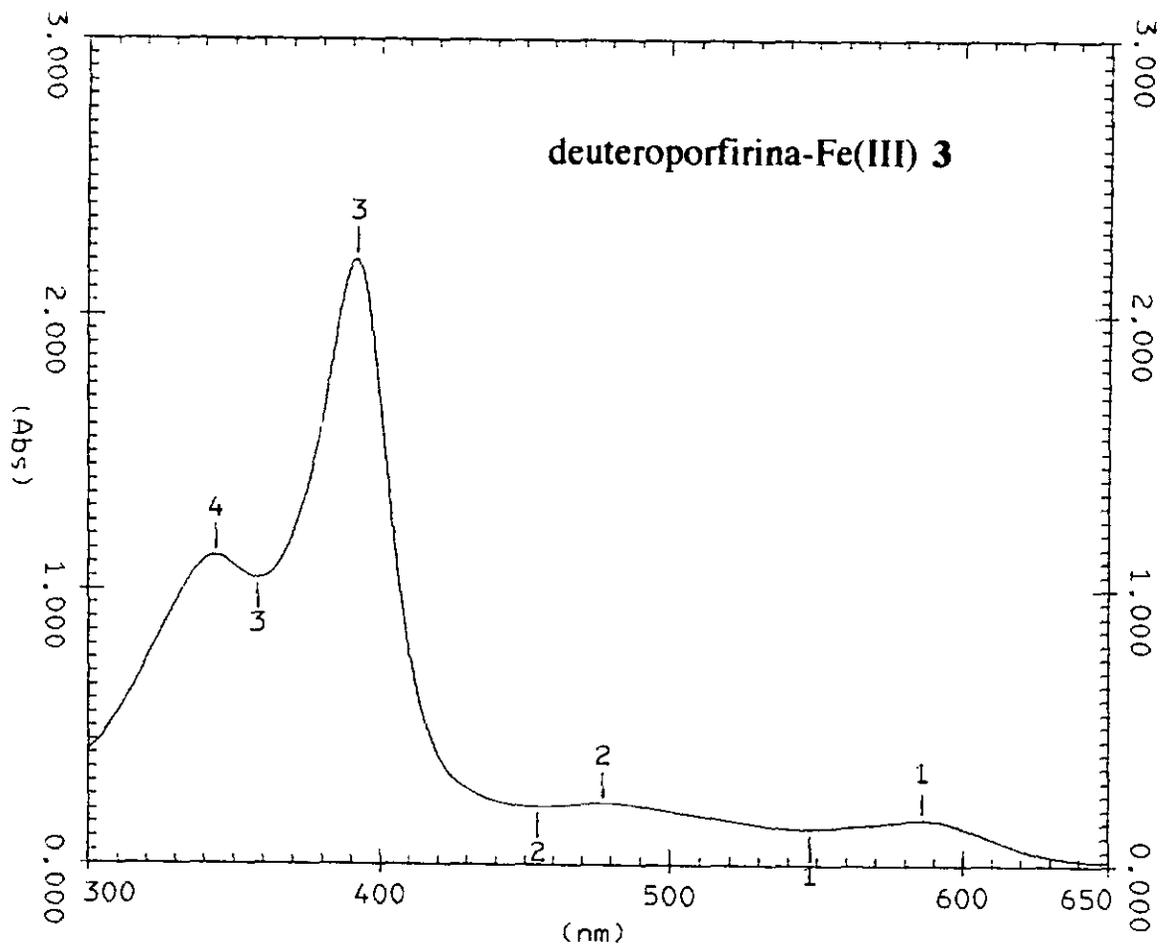


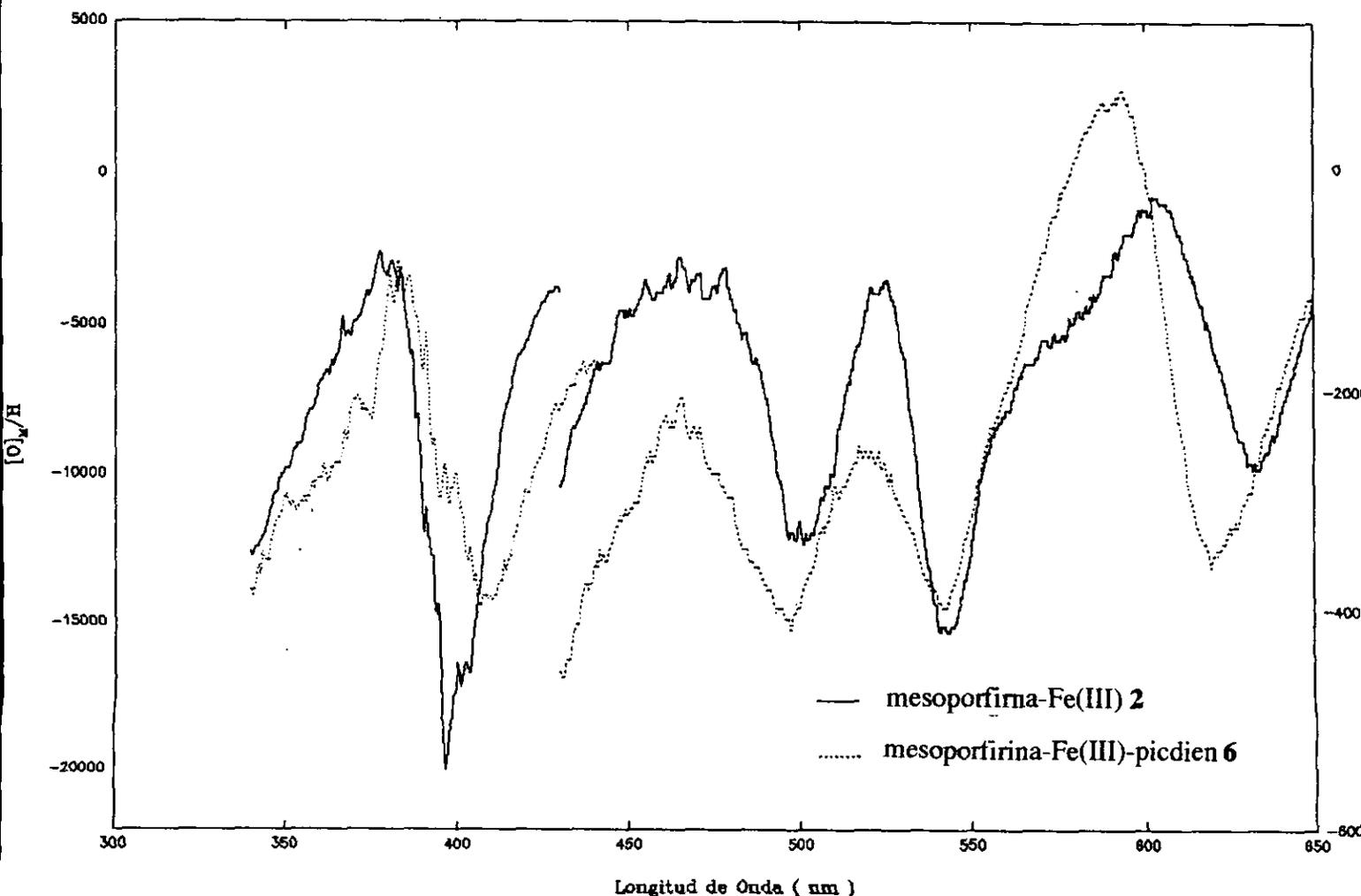
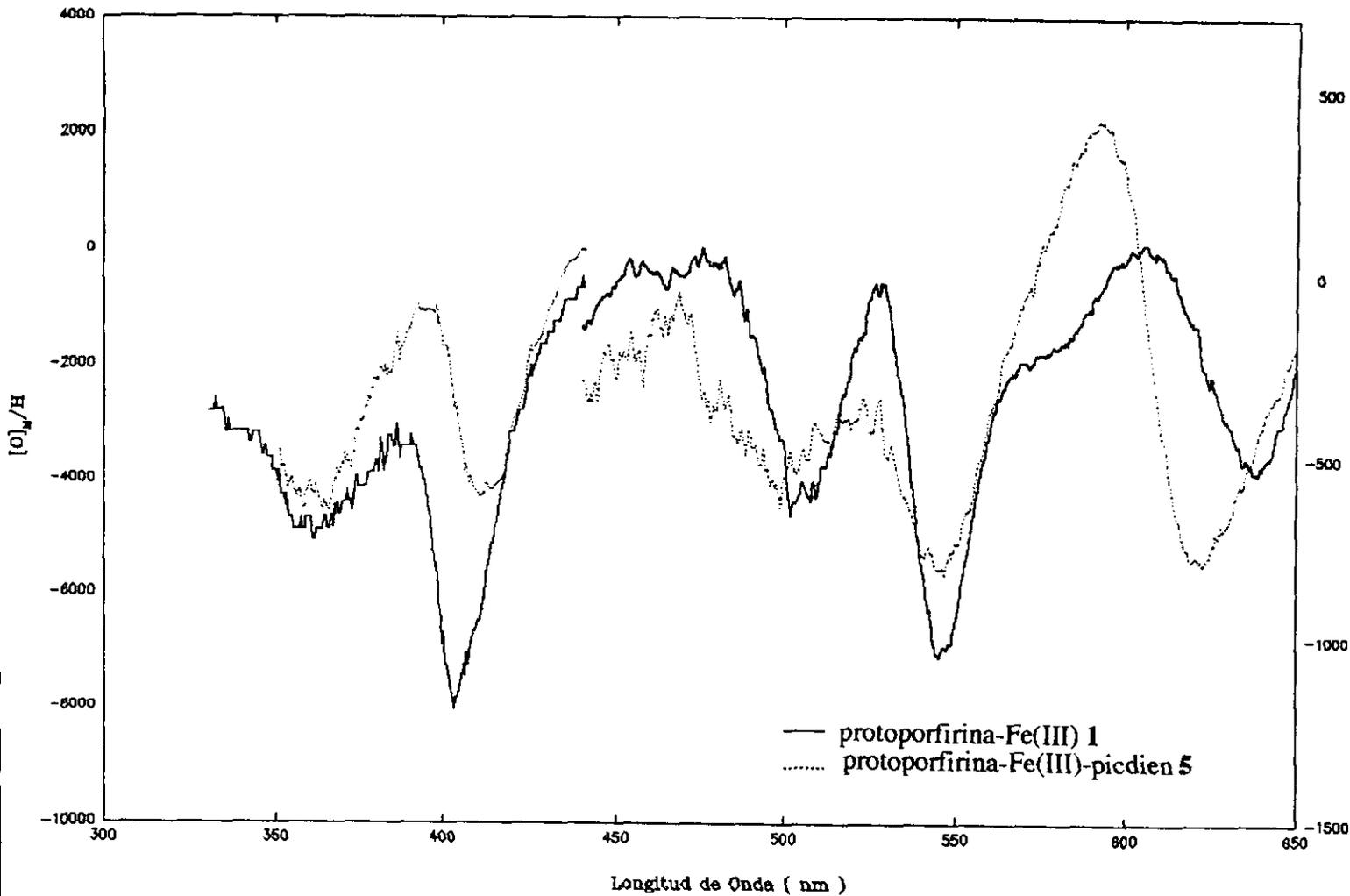


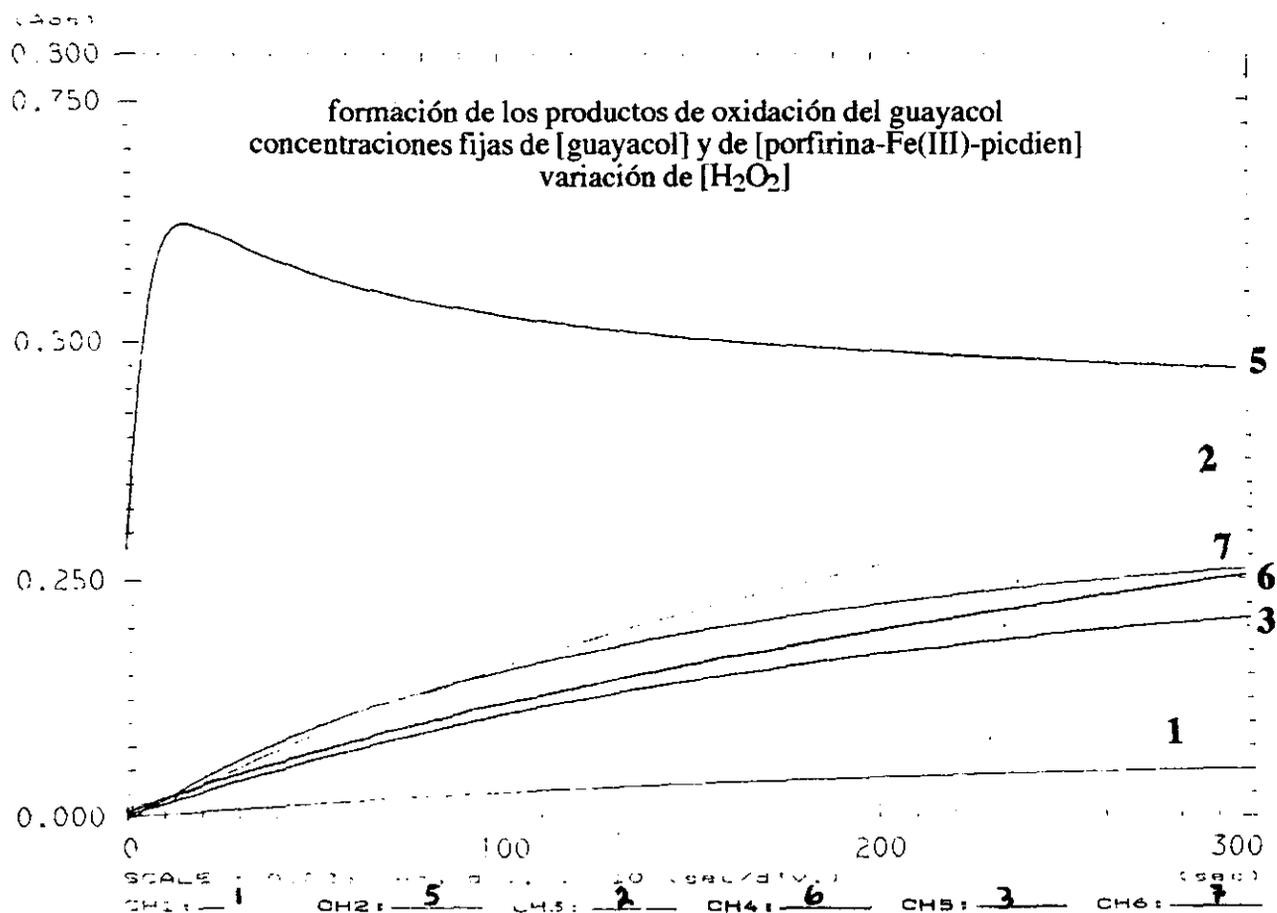
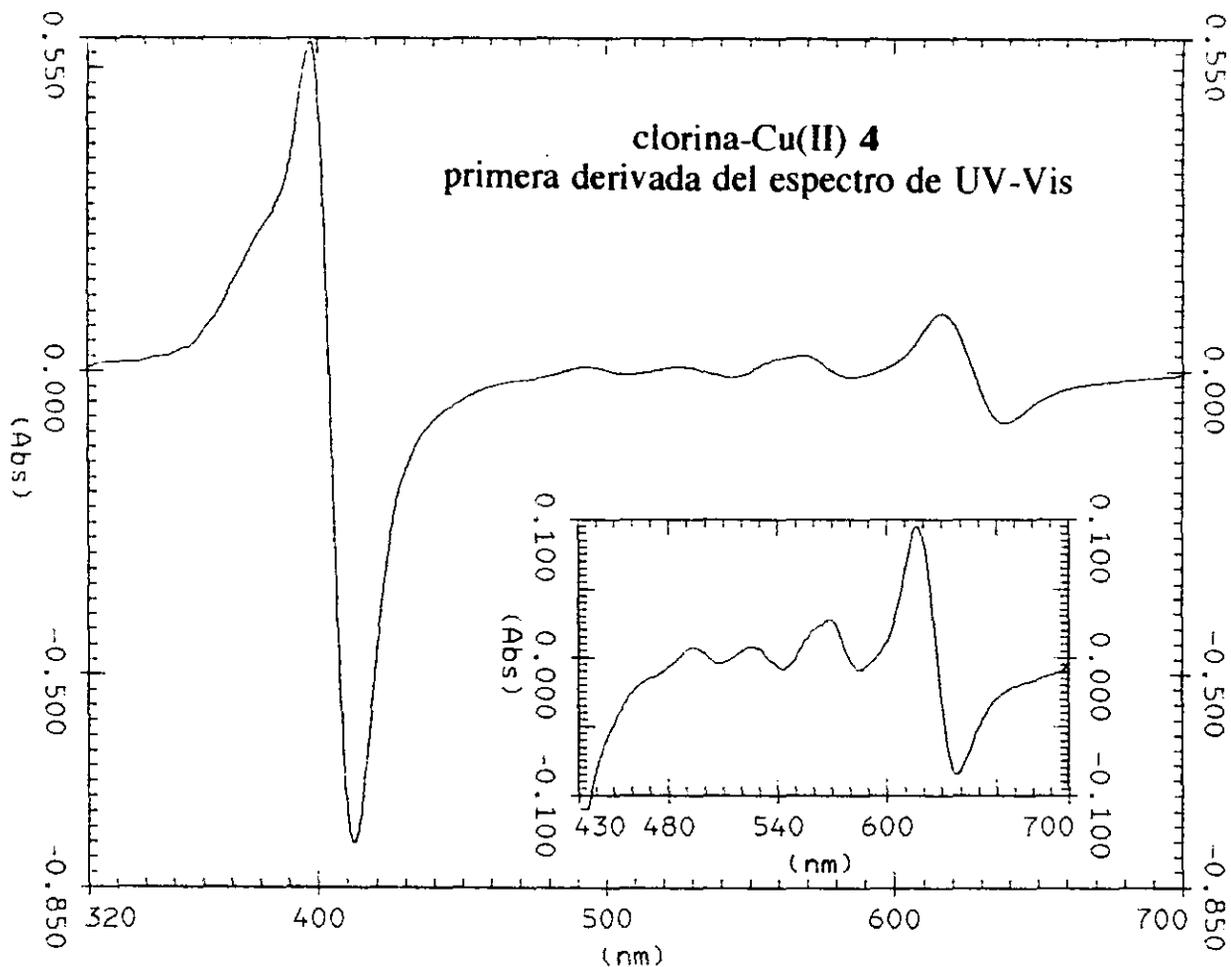


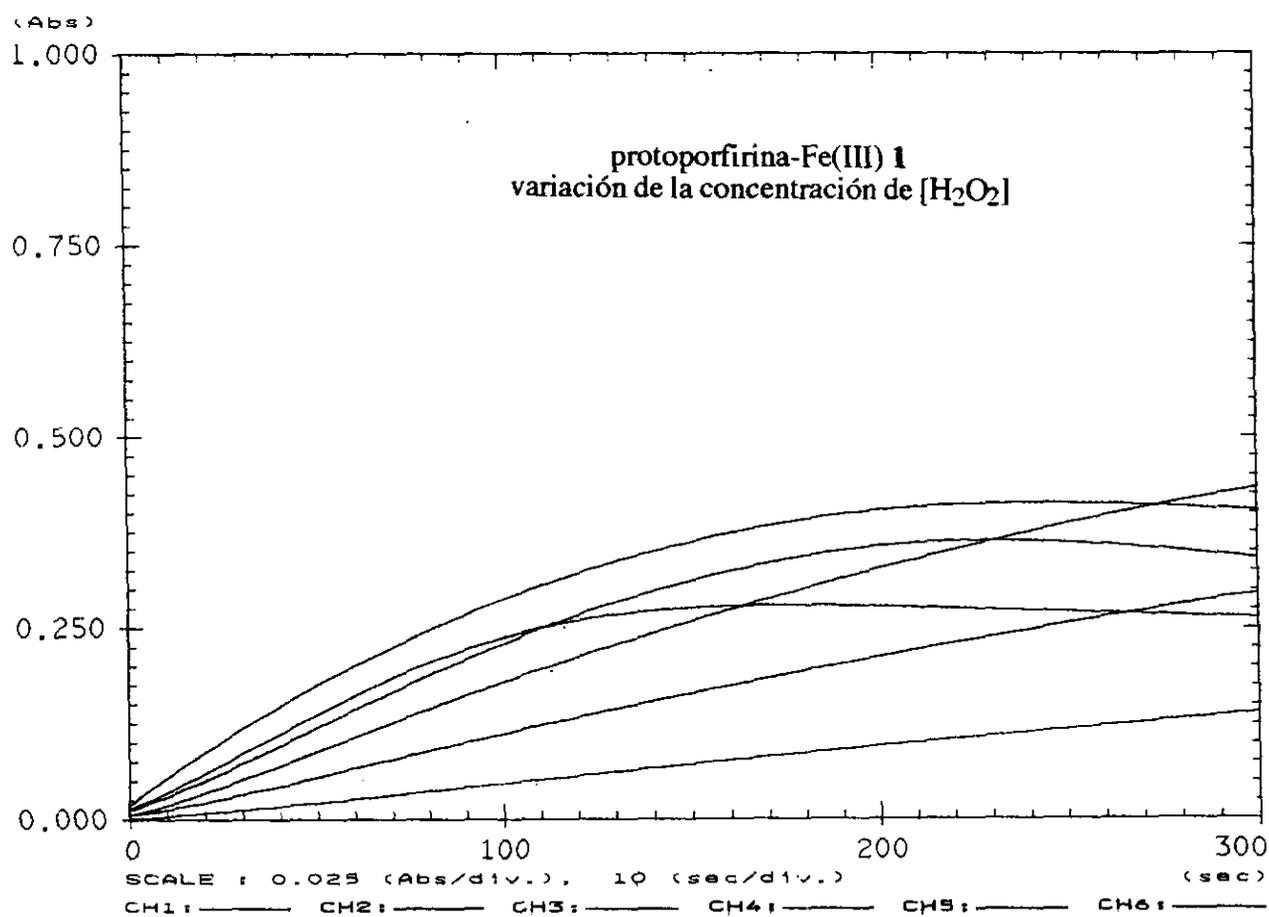
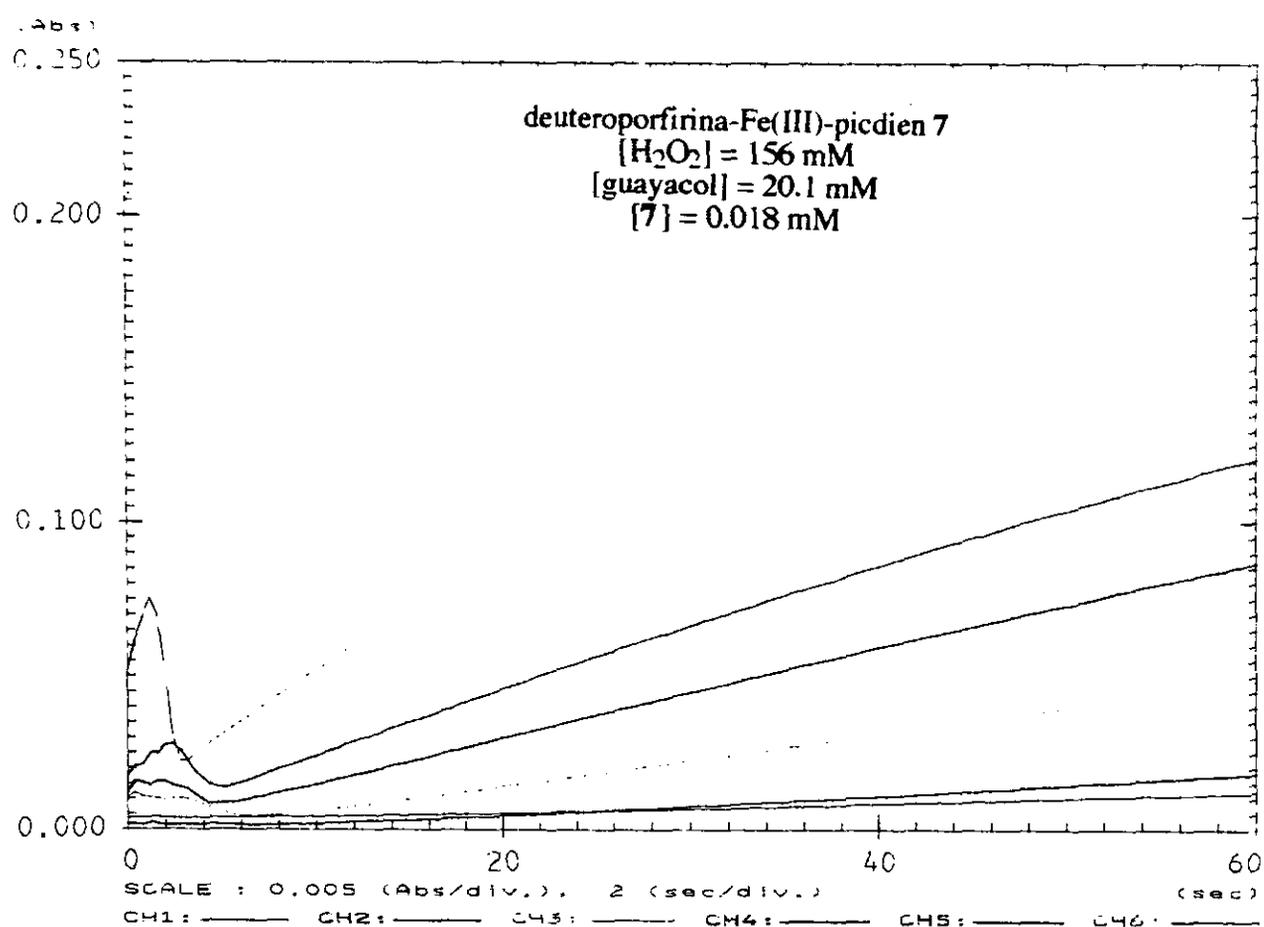












(Abs)

0.500

protoporfirina-Fe(III) 1  
variación de la concentración de [guayacol]

0.250

0.000

0 20 40 60  
SCALE : 0.010 (Abs/div.), 2 (sec/div.) (sec)  
CH1: CH2: CH3: CH4: CH5: CH6:

(Abs)

1.000

complejos 5, 6 y 7  
variación de la concentración de [porfirina-Fe(III)]

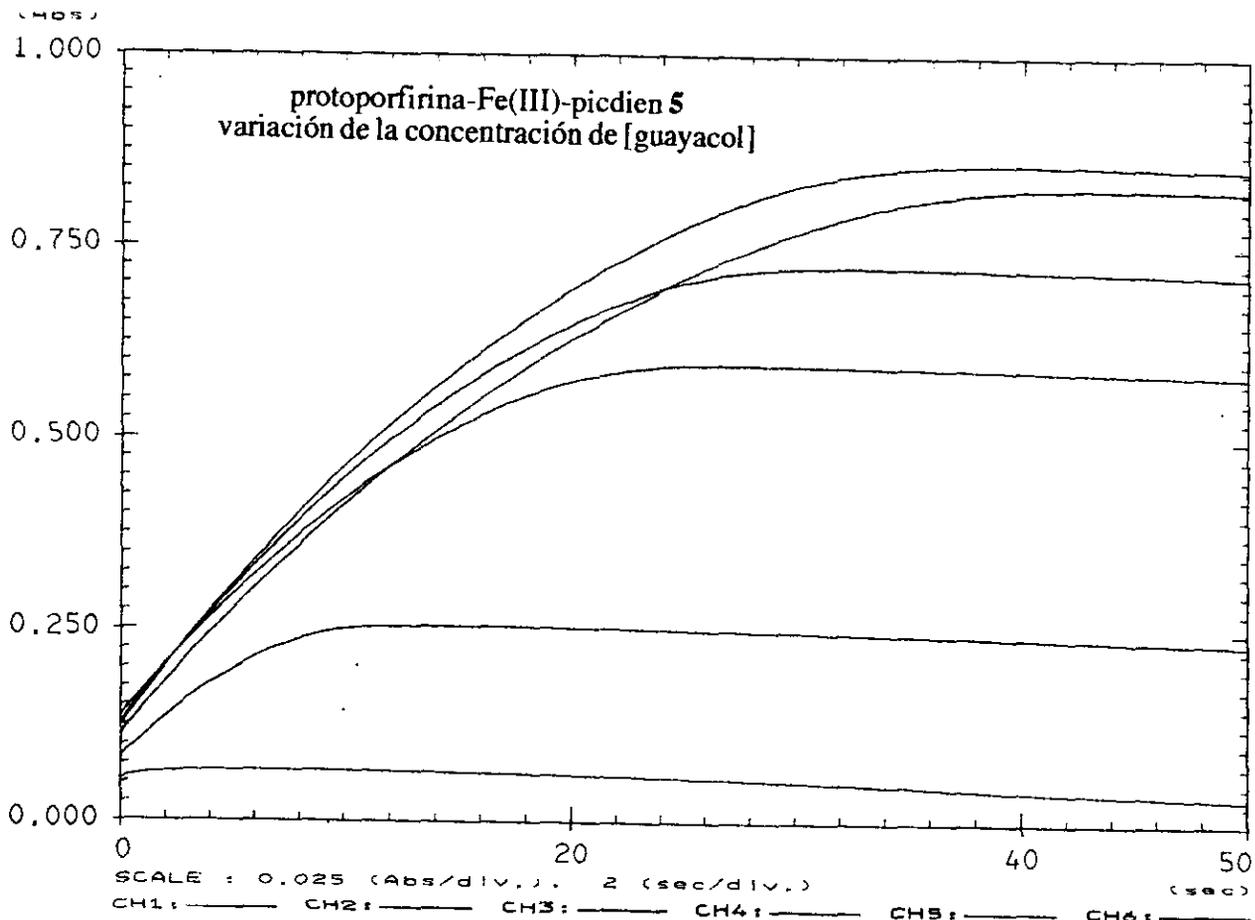
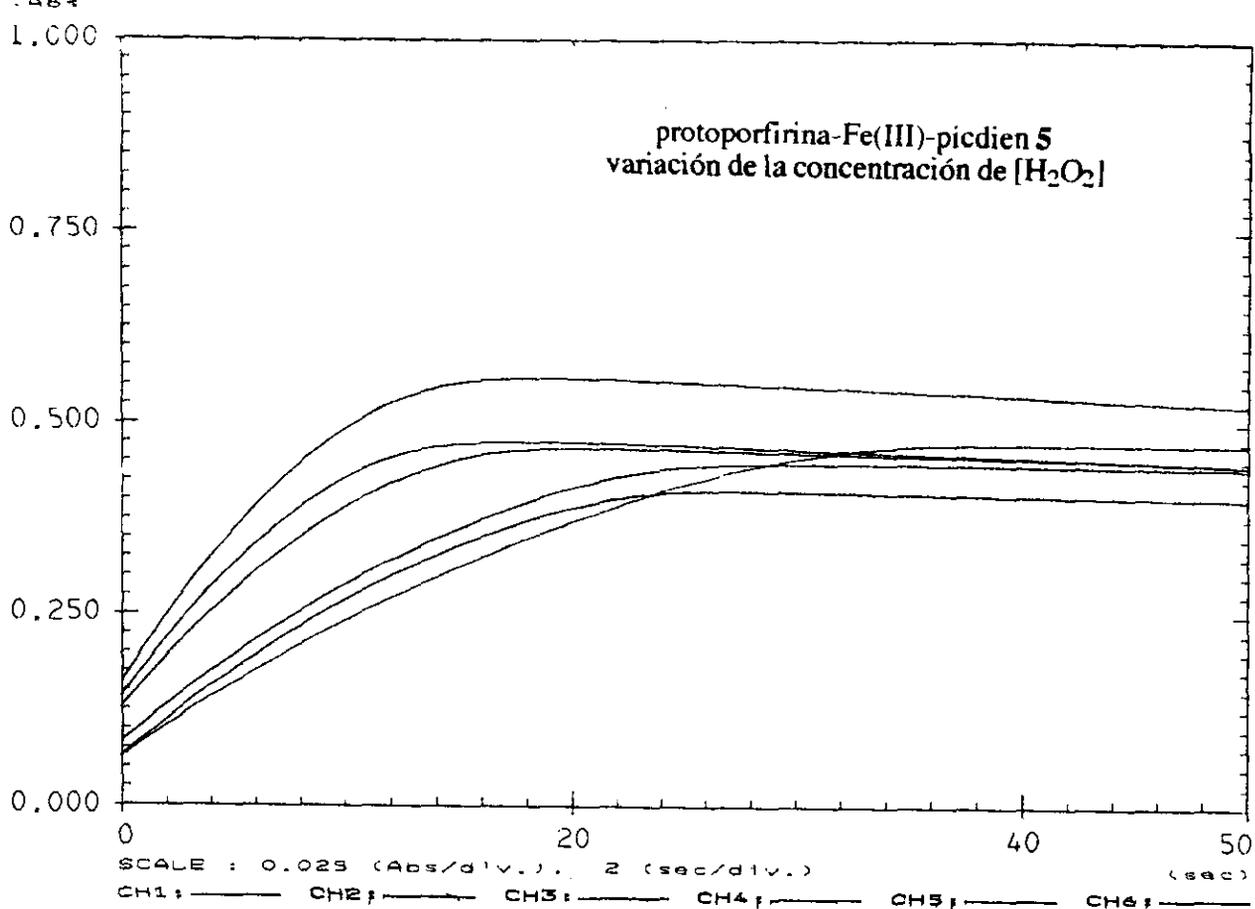
0.750

0.500

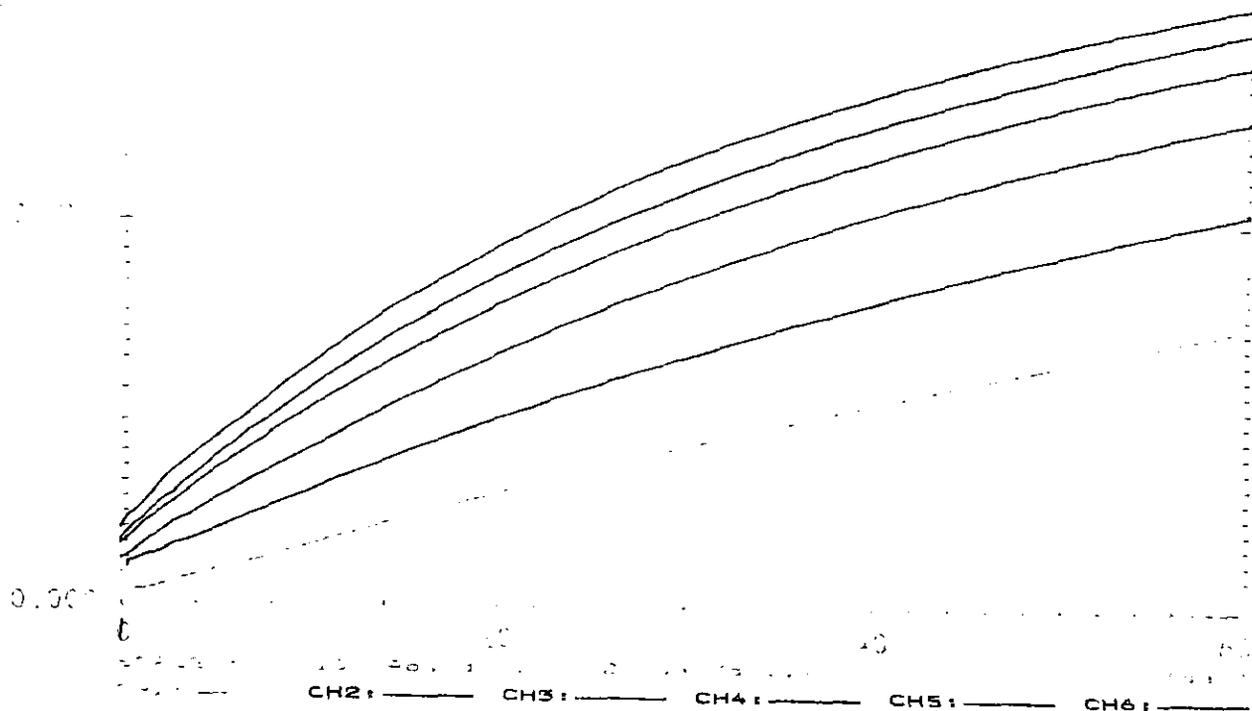
0.250

0.000

0 100 200 300  
SCALE : 0.025 (Abs/div.), 10 (sec/div.) (sec)



deuteroporfirina-Fe(III)-picdien 7  
variación de la concentración de [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]



variación de la concentración de [7]

