

16. Ciencia e Ingeniería de Materiales

Diseño, síntesis y caracterización de nanomateriales mesoestructurados con catalizadores bioinspirados en metaloenzimas.

Patriarca, Matías; Daier, Verónica; Signorella, Sandra

patriarca@iquir-conicet.gov.ar; daier@iquir-conicet.gov.ar ; signorella@iquir-conicet.gov.ar

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

RESUMEN

En este trabajo centramos nuestro estudio en la síntesis y caracterización de materiales mesoestructurados como son las sílicas mesoporosas. Estos materiales tienen superficies modificables con gran afinidad permitiendo, asimismo, un diseño adecuado de distintos tipos y tamaños de poros.

Se sintetizaron dos tipos de sílicas: SBA-15 y MCM-41 a las que se le inmovilizaron complejos de bajo peso molecular que son miméticos de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que actúa dismutando el $O_2^{\cdot-}$. Dichos complejos dinucleares de Cu_2 y $CuZn$, fueron sintetizados y caracterizados previamente mostrando actividad catalítica. El objetivo de la inmovilización de los complejos fue proporcionarles ventajas como ser: mayor superficie de contacto; parámetros geométricos controlables y comprobar si mejora la estabilidad química y mecánica luego de ser unidos a las sílicas. La caracterización estructural se realizó a través de diversas técnicas: SEM, TEM, para observar la morfología de los materiales (Figura 1); Adsorción-Desorción de N_2 para obtener características texturales de los materiales; TGA para estudiar la estabilidad térmica. También se realizaron medidas de susceptibilidad magnética, EPR, XANES, UV-Vis, IR. Una vez caracterizados los materiales, se evaluó la actividad catalítica de tipo SOD, obteniendo buenos resultados.

Palabras clave: sílicas mesoporosas, complejos miméticos, superóxido dismutasa.

INTRODUCCIÓN

Los materiales mesoestructurados representan una importante familia de sólidos porosos. Esta familia de materiales se caracteriza por poseer tamaños de poro uniforme en el intervalo de los

mesoporos con una distribución espacial regular, con la posibilidad de variar y controlar entre 2 y 50 nm su tamaño a través de las diferentes variables de síntesis. Asimismo, los materiales mesoestructurados presentan una elevada

superficie específica y diferentes volumen de poros, lo que les confiere propiedades de gran interés con vistas a su utilización como catalizadores, adsorbentes y soportes. Aunque inicialmente los materiales mesoestructurados se prepararon en forma de silicatos o aluminosilicatos, con posterioridad se ha conseguido la síntesis de sólidos porosos con ese tipo de estructura y una amplia variedad de composiciones químicas.

Uno de los factores claves en la síntesis de materiales mesoestructurados es la presencia de moléculas surfactantes durante la preparación de los mismos, que dan lugar a la formación de estructuras micelares, siendo responsables de la unión y polimerización de las estructuras inorgánicas alrededor de dichas micelas. La posterior eliminación del surfactante por calcinación o extracción con disolventes provoca la aparición de mesoporos uniformes en el material.

Los materiales mesoporosos típicos incluyen algunos tipos de sílice y alúmina que tienen mesoporos de tamaño similar. También se han reportado óxidos mesoporosos de niobio, tántalo, titanio, circonio, cerio y estaño.

La investigación sobre materiales mesoporosos está siendo ampliamente estudiada dada su gran aplicación desde catálisis hasta las aplicaciones médicas y en nanotecnología.

Este trabajo se centró en el diseño, síntesis y caracterización de sílicas

mesoporosas, utilizadas como soportes de complejos miméticos de la enzima superóxido dismutasa (SOD), para su posterior aplicación en catálisis heterogénea.

La enzima SOD es importante para prevenir el estrés oxidativo causado por un desequilibrio entre la producción de oxígeno reactivo y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente las especies reactivas del mismo o reparar el daño resultante. Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células (Riley, 1999). Este entorno reductor es preservado por las enzimas que mantienen el estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. Desbalances en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN. En el ser humano, el estrés oxidativo patológico podría estar involucrado en algunas enfermedades, como la arterosclerosis, el Parkinson y el Alzheimer (Puglisi, Tabb y Vecchio, 2004).

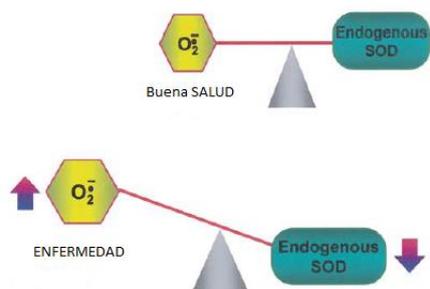
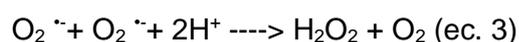


Figura 1: O_2^- involucrado en la salud y enfermedad

Las enzimas superóxido dismutasas (SODs) son la principal defensa contra la toxicidad que producen las especies reactivas del oxígeno (ROS). Las SODs, son un grupo de metaloenzimas presentes frecuentemente en organismos aeróbicos, aerotolerantes y algunos anaerobios obligados. Se conocen cuatro formas de SOD, según el metal que tienen en el centro metálico: CuZn-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD y NiSOD (Szilágyi, Labádi, Hernadi, Palinkó, Fekete, *et al.*, 2005). El citosol de prácticamente todas las células eucariotas contiene la enzima SOD con cobre y zinc (CuZn-SOD).

La CuZn-SOD cataliza la dismutación del O_2^- (ec. 3) con una constante cinética del orden de $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ siendo una de las reacciones más rápidas catalizadas por enzimas.



El uso de la SOD como agente terapéutico para tratar las enfermedades producidas por el desbalance de ROS se encuentra limitado por su tamaño, su carga (que hace difícil la entrada a la célula), y su rápida eliminación del organismo. Por esto

cobra mucha importancia diseñar miméticos de la enzima, sintetizando complejos con actividad superóxido dismutasa, que imiten el sitio activo de la SOD, para poder ser utilizado como posible agente terapéutico.

Diversos grupos han caracterizado complejos heterodinucleares de CuZn y homodinucleares de Cu_2 como modelos de la enzima CuZn-SOD (Yuan, Cai, Qi, Bai, Su, *et al.*, 2009 - Fu, Zhou, Chen, Degin, Tong, *et al.*, 2006). Las actividades encontradas (kcat) son del orden de $10^6 - 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; que son varios órdenes de magnitud menor que la enzima natural ($10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Ohtsu, Shimazaki, Odani, Yamauchi, Mori, *et al.*, 2000).

Al trabajar con complejos miméticos de SOD en solución homogénea la actividad de los mismos puede verse modificada por entorno y/o solventes de trabajo, que pueden reducir su estabilidad. Con el objetivo de aumentar la actividad y controlar los parámetros geométricos es que se recurre a la inmovilización en materiales mesoestructurados como son las sílicas mesoporosas que brindan mayor estabilidad química y mecánica.

El uso de sílicas mesoporosas es de gran utilidad ya que brinda gran superficie de contacto, parámetros geométricos controlables y mayor estabilidad química y mecánica. Además, son superficies modificables con gran afinidad permitiendo asimismo un diseño

adecuado de distintos tipos y tamaños de poros.

En este trabajo se encapsularon los complejos: $\text{CuZn}(\text{Dien})_2\text{Im}(\text{ClO}_4)_3 \cdot (\text{MeOH})$ (**C1**), $\text{Cu}_2(\text{Dien})_2\text{Im}(\text{ClO}_4)_3$ (**C2**) y $\text{CuZn}(\text{Salpn})\text{Cl}_2$ (**C3**), los cuales son miméticos del sitio activo de la enzima SOD, a dos clases de sílicas mesoporosas diferentes: SBA-15 y MCM-41. Los complejos encapsulados fueron caracterizados estructuralmente en estado sólido y solución, y evaluó su actividad SOD comparando la misma con la actividad de los mismos en fase homogénea.

OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivo:

general sintetizar diferentes sílicas mesoporosas y utilizar diversos complejos con sitios metálicos de Cu y Zn, para inmovilizarlos dentro de las sílicas a través de diferentes métodos. Luego evaluar diferentes tipos de actividades catalíticas.

Sintetizar las sílicas mesoporosas: SBA-15 y MCM-41.

Inmovilizar tres clases de complejos dinucleares de Cu-Zn, que son miméticos de la enzima SOD, a las sílicas mesoporosas.

Caracterizar los complejos unidos mediante diversas técnicas: UV-Vis, RPE, TGA, FTIR-ATR, XANES, ADSORCION-DESORCION de N_2 , SEM/TEM, SUCEPTIBILIDAD MAGNETICA, etc.

Analizar la actividad catalítica tipo SOD en dichos complejos inmovilizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos utilizados

Los reactivos utilizados fueron todos de calidad pro-análisis.

Complejos utilizados: los siguientes complejos C1, C2 y C3 fueron sintetizados siguiendo la técnica detallada en: (Daier, Rivière, Mallet-Ladeira, Moreno, Hureau, *et al.*, 2016)

Síntesis de las sílicas mesoporosas (SMPs)

SBA-15 (Thielemann, Girgsdies, Schlogl y Hess, 2011): Se pesan 4,07 g de Pluronic P-123 y se disuelven en 30 mL de agua destilada y 120 mL de HCl 2M en botella de nalgene (PFA: perfluoroalcoxi alcano) de 250 mL a 35 °C. Luego se agregan 9 mL de Tetraetilortosilicato (TEOS) y se deja agitando en un recipiente cerrado a 600 rpm durante 20 h a 35°C. La suspensión resultante se calienta a 85°C por 24 h y se deja enfriar a temperatura ambiente. El precipitado se filtra al vacío con embudo G4 y se realizan lavados con EtOH/agua destilada. Se obtiene un precipitado de color blanco que luego se calcina durante 12 h a 550°C. Se obtuvieron 2,40 g de SBA-15 con un rendimiento del 78 %.

MCM-41 (López, Pérez y López, 2007): Se pesan 1,10 g de Pluronic P-123 y 3,09 g de C16TAB y se disuelven

completamente ambos compuestos bajo agitación en una solución acuosa de HCl (1 mL de HCl cc en 50 mL de agua destilada) con un pH resultante de 5 para dicha solución. Seguidamente se adicionan 4,25 mL de Tetraetilortosilicato (TEOS) gota a gota y se deja agitando durante 24 h. Luego se agregan 0,6 mL de hidróxido de amonio concentrado. El gel resultante se coloca bajo agitación durante 24 h. Se seca a 60 °C durante una semana, obteniéndose así un sólido blanco que luego se calcina durante 3 h a 600 °C. Se obtuvieron 1,32 g de MCM-41 con un rendimiento del 71 %.

Inmovilización de los complejos en las SMPs

La inmovilización de los complejos en las distintas sílicas mesoporosas (SMP) se realizó por el método de intercambio iónico, según una técnica descrita en la literatura (Fang, Lin, Hsu, Lin y Mou, 2011). En la figura 2 se muestra un esquema de la síntesis de la SMP y el anclado del complejo. En una primera etapa se condensan el silicato con el surfactante generando una sílica con poros rellenos de surfactante. Luego el surfactante es eliminado quedando de esta manera la sílica mesoporosa. En la tercera etapa el complejo se inmoviliza a dicha SMP por intercambio iónico, ubicándose en dichos poros.

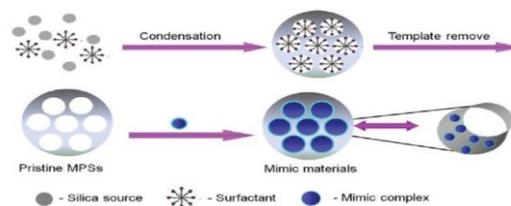


Figura 2: Etapas de la síntesis de las SMPs y encapsulado de los complejos

Para el anclaje de estos complejos a la SMP se disuelven 0,20 mmol del complejo a estudiar en 20 mL de MeOH y se añade a la suspensión 300 mg de la SMP (SBA-15 o MCM-41, dependiendo del complejo a sintetizar). Se deja agitando durante 24 h a temperatura ambiente, se filtra al vacío y se realizan lavados con MeOH. Una vez obtenido el sólido se redissuelve en MeOH y se deja bajo agitación durante una noche para remover residuos. Finalmente se filtra al vacío y se lava nuevamente con MeOH. El producto final es un sólido de color celeste si se trata del C1 y C2 o verde si se trata del C3. Se deja secar el sólido al vacío (Fang, Lin, Hsu, Lin y Mou, 2011).

Se obtuvieron los siguientes complejos inmovilizados en SBA-15: C1@SBA-15, C2@SBA-15 y C3@SBA-15; e inmovilizados en MCM-41: C1@MCM-41, C2@MCM-41 y C3@MCM-41

Determinaciones físicas

Espectroscopía UV-Vis: Los espectros se realizaron en un espectrofotómetro Jasco V530 con celdas de cuarzo a temperatura ambiente, el rango de barrido utilizado es de 200 a 900 nm a una

velocidad de 1000 nm/min. Las muestras se centrifugaron previo a las mediciones ya que son muy insolubles por contener la sílica mesoporosa.

Espectroscopía FT-IR: Las muestras se prepararon como pastillas de KBr. Los espectros fueron adquiridos con un espectrofotómetro IR "Perkin Elmer Spectrum One".

Espectroscopía RPE: Este análisis se realizó en el "Laboratoire de Chimie de Coordination" en Toulouse, Francia. Los espectros de RPE se realizaron en un equipo Bruker Elexsys E500. Los espectros se midieron a 300 K a 9,5 GHz.

Termogravimetría: Este análisis se realizó en el "Laboratoire de Chimie de Coordination" en Toulouse, Francia.

XANES: Las mediciones se realizaron en un equipo BM30B (FAME) beamline de "European Synchrotron Radiation Facility" (ESRF), en Grenoble, Francia.

Microscopía Electrónica de Barrido SEM y Microscopía Electrónica de Transmisión TEM: Se realizaron las microscopías en un equipo: JEM 2100 plus (JOEL) / AMR 1000 (LEITZ) (**SEM**) y **TEM** con S/TEM JEM2100plus con un voltaje de 200 kV, IFIR-CONICET Rosario.

Adsorción-Desorción de N₂: Las isothermas se obtuvieron con un equipo Micrometric ASAP 2020 V4.02 (V4.02 G). Las muestras fueron desgasadas a 200 °C y 10⁻³ Torr durante 6 horas. Para obtener

las características texturales de los sólidos porosos se utilizaron los métodos: BET, alpha-plot, Gulrich y VBS.

Mediciones de actividad superóxido dismutasa: Para determinar la actividad superóxido dismutasa de los complejos se utilizó el método indirecto de la reducción del NBT por O₂^{-•} generado fotoquímicamente descrito por Beauchamps y Fridovich (Beauchamp y Fridovich, 1971) con modificaciones y puesta a punto en nuestro laboratorio. Para ello se prepararon mezclas de reacción de volumen final 3.2 mL conteniendo 50 mM de buffer fosfato (pH= 7.8), 10 mM de metionina, 46 μM de NBT, 34 μM de riboflavina con cantidades variables de complejo. La riboflavina se agregó al final y los tubos utilizados se colocaron a 30 cm de un tubo fluorescente de 40 W de potencia durante 15 minutos, tiempo en el cual el desarrollo de color se comporta linealmente. La reacción se detuvo colocando los tubos en la oscuridad. Se midió la absorbancia a λ= 560 nm y se calculó el porcentaje de inhibición de formazan.

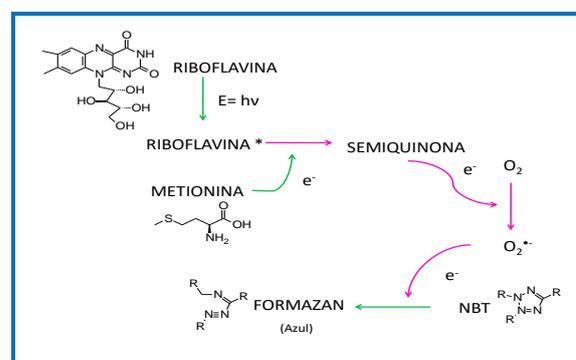


Figura 3: Esquema de las reacciones químicas que ocurren en el método indirecto de la fotorreducción del NBT por el O₂^{•-}

El IC₅₀ es la concentración de complejo responsable de reducir al 50% la formación de formazán (producto de la reacción entre el NBT y el O₂^{•-}). Es importante notar que los valores de IC₅₀ dependen del detector que se use, generalmente NBT o citocromo c-FeIII, y de la concentración del mismo. Para un determinado complejo mimético, mientras menor sea la concentración de detector, menor será el valor de IC₅₀. Por lo tanto los valores de IC₅₀ no son apropiados para la comparación directa con datos de literatura cuando no se trabaja con el mismo protocolo. Para poder comparar los datos se calcula la k_{cat}, constante de velocidad catalítica para el complejo, que es independiente de la concentración de detector.

$$K_{cat} = k_{indicador} * [indicador] / IC_{50}$$

Siendo en nuestro caso, NBT el indicador y k_{NBT} (pH = 7.8) = 5.94 10⁴ M⁻¹ s⁻¹.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Complejos miméticos del sitio activo de la enzima SOD

En la figura 4 se muestra C1, que es un complejo heterodinuclear de CuZn donde el Cu(II) está coordinado sólo a átomos de nitrógenos, y el imidazol actúa como puente entre el Cu y el Zn. Este complejo es estable por encima de pH 3.

El mismo mostró actividad SOD con un IC₅₀ de 0,164 en H₂O.

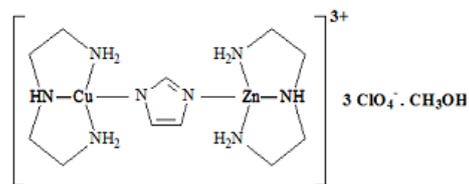


Figura 4: Estructura de C1

En la figura 5 se muestra C2, que es un complejo análogo del complejo 1, pero homodinuclear de Cu₂. Este complejo mantiene su integridad en un rango amplio de pH 4-10 y presentó una buena actividad SOD con un IC₅₀ de 0,158 μM en H₂O.

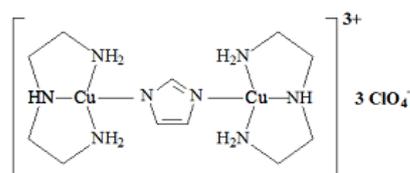


Figura 5: Estructura de C2

En la figura 6 se muestra C3, el cual es un complejo heterodinuclear de CuZn pero contiene una base de Schiff (H₂salpn) en vez de un puente imidazol. En este complejo el Cu(II) está coordinado por dos átomos de nitrógeno imínicos y dos átomos de oxígeno de los fenolatos en una geometría tetragonal ligeramente distorsionada con los átomos de nitrógeno y oxígeno en posición ecuatorial. El Zn se coordina con los átomos de oxígeno del fenolato y los dos cloruros. El complejo es estable entre pH 7 y 10. Tiene buena actividad SOD con un IC₅₀ de 3,2 uM

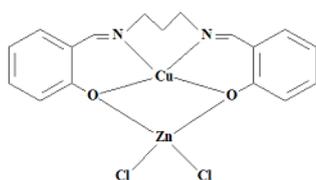


Figura 6: Estructura de C3

Relación de cantidad de complejo inmovilizado en las sílicas por cada 100 g de material.

Se midió a través de absorción atómica de manera indirecta midiendo la cantidad de Cu presente en las aguas madres de la síntesis de inmovilización de los complejos. Estos resultados fueron cotejados con los resultados de TGA. La tabla 1 muestra dicha relación.

Compuesto	mmol of Cu/100 g of hybrid material
C1@SBA-15	27,53
C1@MCM-41	35,42
C2@SBA-15	46,9
C2@MCM-41	27,13
C3@SBA-15	47,36
C3@MCM-41	53,6

Tabla 1: Relación de Cu inmovilizado por cada 100g de material.

Adsorción-Desorción de N₂.

Las siguientes figuras (Fig. 7 y 8) muestran las isothermas de adsorción-desorción correspondientes a cada SMP y a los complejos adsorbidos en dichas sílicas, utilizando N₂ a 77K.

En el caso de la figura 7, la sílica utilizada es la SBA-15. En ellas se puede observar que tiene un loop de histéresis bien definido propio de mesoporos de geometría cilíndrica. Se observa que los loops de las isothermas de los complejos adsorbidos cierran a valores de p/p⁰ menores comparando con la isoterma del SBA-15 y también disminuyen en su tamaño, lo que indica que en dichos materiales el tamaño del poro será inferior. Se observa la existencia de mesoporos secundarios (mesoporos desordenados). Estos materiales también presentan aglomerado de partículas.

Tabla 2: Características texturales para los complejos de Cu y Zn adsorbidos en las SMPs.

	S _{BET} [m ² g ⁻¹]	V _{UP} [cm ³ g ⁻¹]	V _{MP} [cm ³ g ⁻¹]	V _{TP} [cm ³ g ⁻¹]	Wp [nm]
SBA-15	450	0,01	0,48	0,71	8,6
C1@SBA-15	210	0,01	0,13	0,37	7,5
C2@SBA-15	380	0,01	0,40	0,68	8,4
C3@SBA-15	250	0,01	0,17	0,41	6,9
MCM-41	720	0	0,51	0,58	3,4
C1@MCM-41	420	0	0,27	0,33	2,8
C2@MCM-41	490	0	0,34	0,41	3,2
C3@MCM-41	270	0	0,15	0,20	2,3

Realizando el mismo análisis para la figura 8, perteneciente a la sílica MCM-41, se puede observar que el loop de histéresis no es tan definido pero se corresponde también con mesoporos de geometría cilíndrica.

Lo que ocurre en este caso es que esta región está muy cercana a el valor de 0,42 de p/p^0 y esto hace que el loop se deforme. No hay existencia de mesoporosidad secundaria ni de aglomerado de partículas, ya que las isothermas se mantienen muy horizontales a medida que aumenta p/p^0 .

La primera región de las isothermas corresponde al llenado de microporos. Las MCM-41 no contienen microporosidad aunque sus isothermas tengan una marcada pendiente en esta zona. Esto se debe a que tienen mesoporos pequeños que producen una fuerte interacción adsorbato-adsorbente, lo que hace que la forma de la isoterma parezca la de un material microporoso. En el caso de las SBA-15 esto no sucede, los mesoporos son más grandes, la isoterma es bien definida y la pendiente en la zona del llenado de microporos indica la existencia de una leve microporosidad.

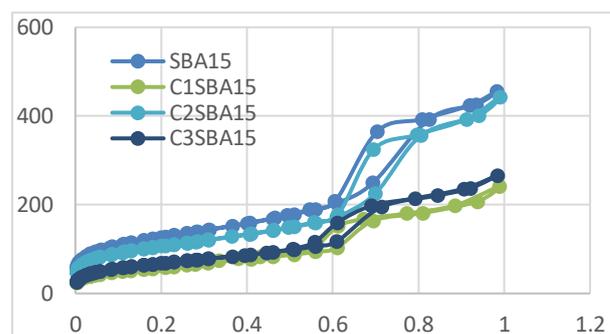


Figura 7: Isothermas de Adsorción-Desorción de N2 para la familia de SBA-15.

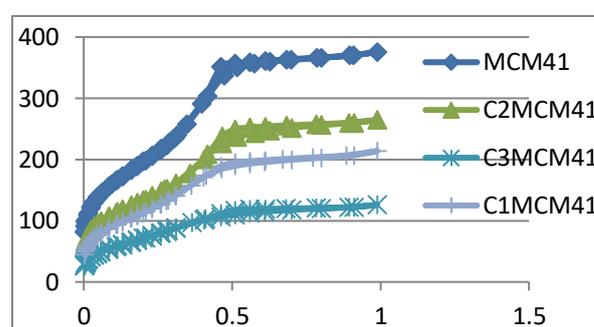


Figura 8: Isothermas de Adsorción-Desorción de N2 para la familia de MCM-41.

La distribución del tamaño de poros se realizó aplicando el método VBS (Villaroel-Barrera-Sapag) (Sapag, 2011). En este método se aplica la ecuación de Kelvin modificada en un factor fc en la región del loop de histéresis donde se produce la condensación capilar.

En la tabla 2 se resumen las características texturales de estos materiales porosos (ver tabla 2).

Microscopías SEM y TEM

Por medio de esta técnica se puede obtener información acerca de la morfología del compuesto. En las siguientes imágenes se puede observar la

morfología de cada sílica. En ellas se puede apreciar una morfología esférica para la MCM-41 y otra tipo bastón para la SBA-15 (Fig. 9). También se observan los mesoporos en las imágenes de TEM (Fig. 10)

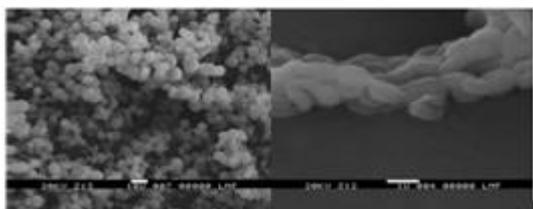


Figura 9: Imágenes obtenidas por SEM de las SMPs. MCM-41 (izquierda) y SBA-15 (derecha)

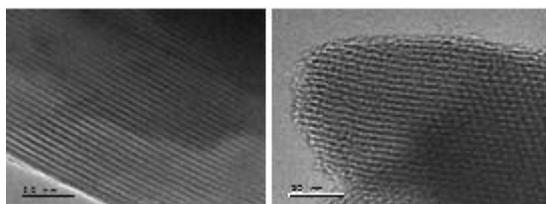


Figura 10: Imágenes obtenidas por TEM de las SMPs. MCM-41 (izquierda) y SBA-15 (derecha)

Espectroscopía UV-Vis. Estabilidad en el tiempo

Con el fin de garantizar la integridad de los complejos anclados a la sílicas mesoporosa, SBA-15 y MCM-41, y con esto corroborar que durante el tiempo de medición de actividad no se desprenda complejo de la SMP para poder realizar mediciones confiables de SOD, es que se realizaron espectros secuenciales de UV-Vis en el tiempo hasta 24 horas. Los estudios se realizaron suspendiendo los complejos anclados en buffer fosfato (pH=7,8), centrifugando y luego se procedió a la medición. Esto se realizó en varios batch durante 24 hs. Los complejos

libres en solución presentan un pico a $\lambda=615$ nm característico del Cu(II). Si en los espectros de los complejos unidos a la SMPs aparece dicha banda o se corre a longitudes de onda diferentes, se infiere que en los mismos se produjo desprendimiento del complejo de la sílica. Los porcentajes de desprendimiento de complejo llegan como máximo al 20% concluyéndose la estabilidad de los complejos adsorbidos por las SMPs.

Termogravimetría

Pudo comprobarse que a temperaturas menores a 200°C se observa la deshidratación de los materiales. Alrededor de 240°C el ligando orgánico comienza a liberarse del material, descomponiéndose totalmente.

Con los resultados de TGA se corroboraron los resultados de absorción atómica y pudo comprobarse la cantidad de complejo adsorbido en cada sílica.

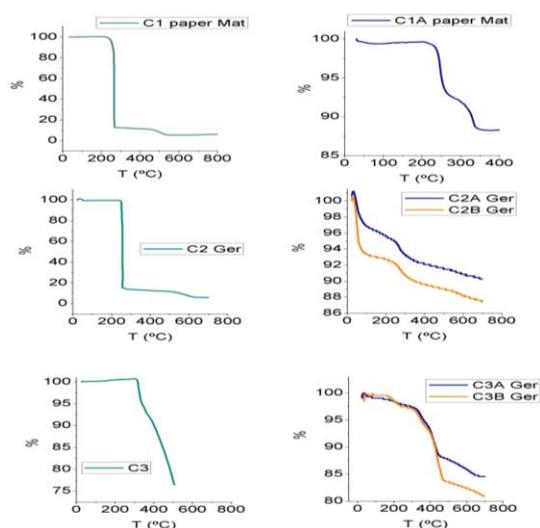


Figura 11: TGA de los complejos y los mismos inmovilizados

Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (RPE)

Los parámetros adquiridos de un espectro de RPE dan información acerca de la geometría del centro paramagnético. La enzima nativa CuZn-SOD tiene $g_{\perp}=2,05$, $g_{\parallel}=2,26$ y $A_{\parallel}=151$ G. Estos valores en los parámetros indican que la geometría en el sitio de Cu se acerca a una cuadrada plana.

En las tablas 3 y 4 se informan los valores de los parámetros espectrales de los mismos. Los parámetros obtenidos para el C1@SBA-15 están dentro del rango de valores que corresponden a una geometría tetragonal en el sitio metálico. Al observar los valores de los parámetros del C2 unido a SBA-15 y MCM-41, éstos se corresponden con una simetría cuadrada plana. Para los valores de los parámetros espectrales encontramos que el C3 inmovilizado en las diferentes SMPs, se encuentra en un entorno tetragonal distorsionado.

Los valores son similares a los de los complejos libres indicando que se mantiene la geometría al estar unido a la sílica.

	g_{\parallel}	g_{\perp}	A_{\parallel}	A_{\perp}
C1	2,23	2,01	180 G	18 G
C1@SBA-15	2,121	2,043	193 G	54 G
C2	2,21	2,05	190 G	
C2@SBA-15	2,12	2,061	89 G	91,5 G
C2@MCM-41	2,24	2,027	179 G	151 G

Tabla 3: Parámetros espectrales de RPE de los complejos y los mismos inmovilizados a las SMPs

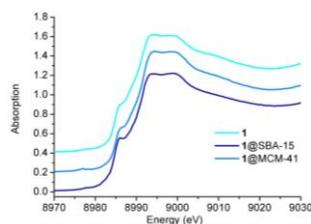
	g_{iso}	A_{iso}
C3	2,06	76 G
C3@SBA-15	2,053	82 G
C3@MCM-41	2,052	82 G

Tabla 4: Parámetros espectrales de RPE de los complejos y los mismos inmovilizados a las SMPs

Espectroscopía Xanes

Se realizaron espectros de XANES, pertenecientes a los metales cobre y zinc, a los complejos libres y unidos a las sílicas con el fin de obtener información acerca de la geometría del sitio metálico y el estado de oxidación de cada metal.

El espectro de XANES, para el metal Cu, muestra la absorción del C1 y C1@SBA-15. Si observamos sólo el C1, el mismo contiene un pico "pre-edge" a una energía de 8978 eV correspondiente a la transición $1s \rightarrow 3d$. Su pico de máxima amplitud se encuentra cercano a 9000 eV



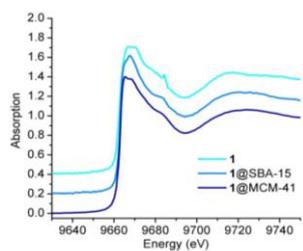


Figura 12: Espectros de Xanes de: C1, C1@SBA15, C1@MCM41. (Para el Cu 1ero, Zn 2do)

(8995 eV) y corresponde a una transición $1s$ y contiene además un flanco a 8986 eV correspondiente a la transición metal-ligando $1s \rightarrow 4p$. Este análisis concuerda con los rasgos característicos de una geometría tetragonal con el cobre con estado de oxidación Cu(II).

Al analizar el espectro perteneciente al C1@SBA-15, no se observan diferencias apreciables con respecto al espectro del C1 en solución homogénea, lo que indica que la unión a la SMP no produjo alteraciones en la estructura.

Al analizar los espectros correspondientes al metal Zn no se observa un rasgo de "pre-edge" pero se pueden apreciar tres rasgos, ellos son: un pico a 9667 eV, otro a 9670 eV y el tercero a 9684 eV. Esto es típico de una geometría tetraédrica distorsionada. Su pico de máxima amplitud se encuentra a 9670 eV correspondiente a la transición $1s \rightarrow 4p$. Ambos espectros nuevamente no se diferencian considerablemente unos de otros por lo que se concluye que el anclado a la SMP no modifica la integridad estructural del C1.

Siguiendo el mismo análisis del complejo anterior, se observa que ocurre un proceso muy similar para los casos de C2, C3 y los mismos inmovilizados. Esto confirma nuevamente que el Cu está en un estado de oxidación Cu(II) y se encuentra con una geometría tetragonal y que la inmovilización a las SMPs no altera la estructura del sitio metálico de los complejos. Solo se muestran los espectros pertenecientes al complejo C1 (Fig. 12).

Espectroscopía IR

Se realizaron espectros IR comparando la sílica, el complejo libre y el mismo unido a la sílica. Se pudo observar en todos los casos la existencia del complejo inmovilizado en comparación con el espectro de la sílica mesoporosa correspondiente. A continuación se muestran los espectros pertenecientes al complejo C3 en ambas SMPs:

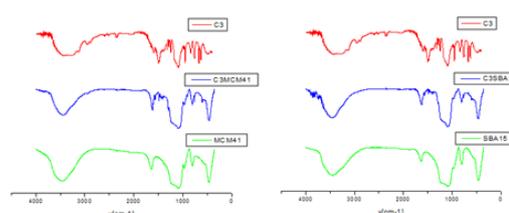


Figura 13: Espectros de IR

Los espectros de C3 unido a las sílicas mesoporosas, comparados con los de las SMPs, son muy parecidos pero se puede apreciar una leve diferencia debida a la unión del complejo.

Actividad del tipo SOD

Posterior a la síntesis y caracterización de los complejos unidos a las SMPs, se determinó la actividad SOD de los mismos. A continuación se muestran los resultados y conclusiones para cada complejo.

Se utilizó un método indirecto de medición de la actividad, con NBT como indicador, previamente explicado en la sección de materiales y métodos.

En la figura 14 puede observarse las curvas del % de inhibición de la actividad SOD.

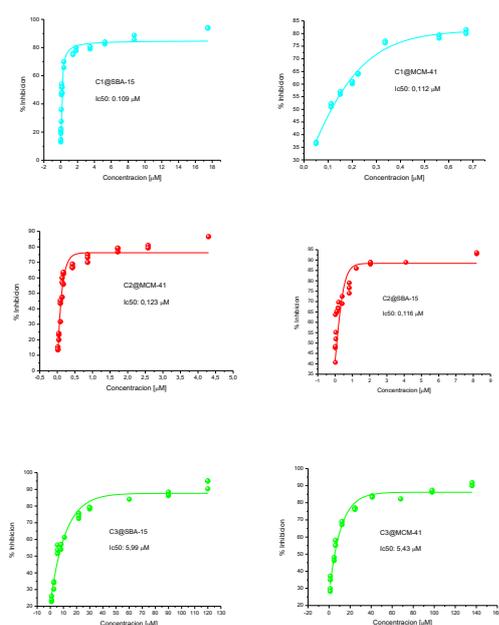


Figura 14: Actividad SOD.

Los tres complejos sintetizados presentan muy buena actividad SOD. El proceso de dismutación del anión radical superóxido implica la óxido-reducción de la cupla Cu(II)/Cu(I). Los factores que influyen en el mecanismo de esta reacción en la

COMPLEJO	IC ₅₀ [μM]	k _{cat} [M ⁻¹ s ⁻¹]
CuZn-SOD (nativa)	0,00122	2 x 10 ⁹
C1•SBA-15	0,109	2,51 x 10⁷
C1•MCM-41	0,112	2,44 x 10⁷
C2•SBA-15	0,116	2,35 x 10⁷
C2•MCM-41	0,123	2,22 x 10⁷
C3•SBA-15	5,99	4,56 x 10⁵
C3•MCM-41	5,43	5,03 x 10⁵
C1	0,423	6,46 x 10 ⁶
C2	0,35	7,80 x 10 ⁶
C3	3,2	0,85 x 10 ⁶

Tabla 5: IC₅₀ y K_{cat}

enzima son: la estructura del sitio activo, el potencial redox, la especificidad y la capacidad de unirse al sustrato, la cinética para los diferentes pasos de la reacción y la estabilización de los posibles intermediarios, entre otros. Cuanto más parecidos sean los complejos miméticos al sitio activo de la enzima y reúnan estos factores, mayor actividad deberían mostrar. La tabla 5 resume los valores comparativos de IC₅₀ de los tres complejos anclados a las SMPs, el de la enzima nativa CuZn-SOD y de los tres complejos libres. Además se muestran los valores de k_{cat} de cada uno para poder comparar correctamente las actividades catalíticas independiente del método utilizado.

Los valores de actividad de los complejos unidos a las SMPs son del mismo orden que los complejos libres, mejorados en algunos casos.

Ciclos catalíticos para la actividad SOD

Se realizaron diferentes volumetrías (cuba neumática) utilizando KO_2 en DMSO con agregado de H_2O y complejo adsorbido, obteniendo de esta forma un método directo de medición de actividad SOD, hasta encontrar las condiciones adecuadas para estudiar los ciclos catalíticos que soportan los complejos adsorbidos. Tras varios ensayos se llegó a las condiciones óptimas. Se realizó el ensayo solo con el complejo C2 adsorbido en SBA-15, previo a esto se realizó un ensayo de estabilidad de dicho complejo en DMSO. Luego se realizó una tercera volumetría en las mismas condiciones pero esta vez con el complejo C2 libre a modo de comparación, para ver si el complejo adsorbido soporta más cantidad de ciclos catalíticos debido a la estabilidad que le confiere la sílica mesoporosa.

Se pudo corroborar que al estar unidos a las sílicas mesoporosas soportan más ciclos catalíticos que estando libres, lo que mejora su performance para ser usados como catalizadores.

CONCLUSIONES

Se sintetizaron satisfactoriamente las sílicas mesoporosas SBA-15 y MCM-41 y se logró encapsular a las mismas los siguientes complejos:

C1:
$[\text{CuZn}(\text{dien})_2\text{Im}](\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{MeOH}$
C2:
$[\text{Cu}_2(\text{dien})_2\text{Im}](\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{MeOH}$
C3:
$\text{CuZn}(\text{salpn})\text{Cl}_2$

Los 3 complejos unidos a las sílicas mesoporosas fueron caracterizados espectroscópicamente por FTIR-ATR, EPR, UV-Vis y XANES. Se determinó la relación de moles de Cu por cada 100 g de material, la geometría del sitio metálico, la estabilidad en solución y el estado de oxidación y geometría de coordinación de los metales. Se realizó un tratamiento térmico (TGA) para evaluar la estabilidad térmica de los complejos encapsulados a las sílicas y se realizó una caracterización textural de estos materiales mesoporosos por medio de: adsorción y desorción de N_2 y Microscopia SEM y TEM. Esta información nos permite confirmar que los complejos anclados a las SMPs retienen la estructura de los mismos sin inmovilizar. Se evaluó la actividad SOD de los complejos unidos a SMPs, la misma está en el orden de actividad de los mejores complejos estudiados en fase homogénea.

El hecho que la actividad catalítica de los complejos anclados a SMPs sea similar o superior a la actividad en fase homogénea de los complejos informados en literatura, hace que esta estrategia de trabajo sea muy promisorio para el diseño de posibles agentes terapéuticos y/o catalizadores que aprovechen las ventajas de trabajar con este tipo de materiales.

BIBLIOGRAFÍA

Beauchamp C., Fridovich I.
Superoxide Dismutase: Improved assays and an Assay
Applicable

to Acrylamide Gels. *Anal. Biochem.* 44, 276 (1971).

Daier V. A., Rivière E., Mallet-Ladeira S., Moreno D., Hureau C. and Signorella S. R. *Synthesis, Characterization and Catalytic activity of Imidazolate-Bridged and Schiff-Base Dinuclear Complexes as Models of Cu,Zn-SOD. A Comparative Study.* *J. Inorg. Biochem.*, 2016

Fang Y-C., Lin H-C., Hsu I-J., Lin T-S. y Mou C-Y. *Bioinspired Design of a Cu-Zn-Imidazolate Mesoporous Silica Catalyst System for Superoxide Dismutation.* *J. Phys. Chem. C*, 115, 20639 (2011)

Fu H., Zhou Y.-H., Chen W.-L., Degin Z.-G., Tong M.-L., Ji L.-N., Mao Z.-W. *Complexation, Structure, and Superoxide Dismutase Activity of the Imidazolate-Bridged Dinuclear Copper Moiety with β -Cyclodextrin and Its Guanidinium-Containing Derivative.* *J. Am. Chem. Soc.* 128, 4924 (2006).

López J. F., Pérez L. D. y López B. L. *Síntesis y caracterización de nanohíbridos poliestireno / sílica mesoporosa MCM-41.* *Scientia et Technica* Año XIII, No 36, Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122, (2007).

Ohtsu H., Shimazaki Y., Odani A., Yamauchi O., Mori W., Itoh S. y Fukuzumi S. *Synthesis and Characterization of imidazolate-Bridged Dinuclear Complexes as Active Site Models of Cu,Zn-SOD.* *J. Am. Chem. Soc.* 122, 5733 (2000).

Puglisi A., Tabb G., Vecchio G. *Bioconjugates of cyclodextrins of manganese salen-type ligand with superoxide dismutase activity.* *J. Inorg. Chem.* 98, 969 (2004).

Riley D. *Funcional Mimics of Superoxide Dismutase Enzymes as Therapeutic Agents.* *Chem. Rev.* 99, 2573 (1999).

Sapag, K. (2011). Improvement in the Pore Size Distribution for Ordered Mesoporous Materials with Cylindrical and Spherical Pores Using the Kelvin Equation, 121–134.

Szilágyi, I.; Labádi, I.; Hernadi, K.; Palinkó, I.; Fekete, I.; Korecz, L.; Rockenbauer, A. y Kiss, T, *Superoxide dismutase activity of a Cu–Zn complex—bare and Immobilised.* *New. J. Chem.* 29, 740 (2005).

Thielemann J. P., Girgsdies F., Schlogl R. and Hess C. *Pore structure and Surface area of silica SBA-15: influence of washing and scale-up.* *Beilstein J. Nanotechnol.*, 2, 110, (2011).

Yuan Q., Cai K., Qi Z.-P., Bai Z.-S., Su Z., Sun W.-Y.. *Imidazolate-bridged dicopper(II) and copper(II)-zinc(II) complexes of macrocyclic ligand with methylimidazol pendants: Model study of copper(II)-zinc(II) superoxide dismutase.* *J. Inorg. Biochem.* 103, 1156 (2009).

AGRADECIMIENTOS

CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - UNR.

FINANCIAMIENTO

CONICET PIP 112-201501-00337