



FACULTADE DE CIENCIAS

GRAO EN BIOQUÍMICA

D.^a Ana Gándara Lafuente

**NOVOS CATALIZADORES
BIOMIMÉTICOS DE MANGANESO:
ESTUDO DA SÚA ACTIVIDADE
ANTIOXIDANTE.**

Traballo Fin de Grao

Xuño 2025

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumo..... | 3 |
| Palabras clave: | 3 |
| Resumen..... | 4 |
| Palabras clave: | 4 |
| Abstract. | 5 |
| Keywords:..... | 5 |
| 1. Introducción | 6 |
| 1.1. Estrés oxidativo e modelos biomiméticos. | 6 |
| 1.2. Encima peroxidase. | 9 |
| 1.3. Encima catalase..... | 10 |
| 1.4. Encima catecol oxidase. | 12 |
| 2. Obxectivos..... | 15 |
| 3. Material e Métodos. | 16 |
| 3.1. Disolventes e reactivos. | 16 |
| 3.2. Síntese de compostos. | 17 |
| 3.2.1. Síntese do ligando. | 17 |
| 3.2.2. Síntese do complexo metálico $MnL(OAc)(H_2O)$ | 18 |
| 3.3. Técnicas experimentais. | 19 |
| 3.3.1. Análise elemental. | 19 |
| 3.3.2. Determinación dos puntos de fusión. | 19 |
| 3.3.3. Medidas espectrofotométricas no infravermello. | 19 |
| 3.3.4. Medidas da condutividade..... | 19 |
| 3.3.5 Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear. | 20 |
| 3.3.6. Espectroscopia Ultravioleta - Visible (UV-vis)..... | 20 |
| 3.3.7. Espectrometría de masas. | 20 |
| 3.3.8. Cristalografía de Raios X. | 20 |
| 3.3.9. Estudo da voltametría cíclica. | 21 |
| 3.4. Estudos de actividade mimética de diferentes encimas antioxidantes. . | 22 |
| 3.4.1. Estudo da actividade catalítica como peroxidase. | 22 |
| 3.4.2. Estudo da actividade catalítica como catalase..... | 23 |
| 3.4.3. Estudo da actividade catalítica como catecol oxidase. | 24 |

| | |
|--|----|
| 4. Resultados e Discusión..... | 25 |
| 4.1. Síntese e caracterización dos compostos. | 25 |
| 4.1.1. Síntese e caracterización de H ₂ L. | 25 |
| 4.1.2. Síntese e caracterización do complexo metálico..... | 27 |
| 4.2. Estudo da actividade biomimética do complexo metálico. | 36 |
| 4.2.1. Estudo da actividade catalítica como mimético da peroxidase..... | 36 |
| 4.2.2. Estudo da actividade catalítica como mimético da catalase. | 38 |
| 4.2.3. Estudo da actividade catalítica como mimético da catecol oxidase. | 38 |
| 5. Conclusións..... | 41 |
| 6. Referencias..... | 42 |

NOVOS CATALIZADORES BIOMIMÉTICOS DE MANGANESO: ESTUDO DA SÚA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE.

Resumo.

O manganeso é un metal esencial que participa en numerosos procesos biolóxicos. Está presente no centro activo ou actúa como cofactor de antioxidantes naturais. Por iso, o uso de complexos de manganeso presenta unha potencial aplicación como un modelo biomimético destes encimas antioxidantes. A función destes encimas é neutralizar ás especies reactivas de osíxeno, fortes oxidantes que causan o estrés oxidativo, para manter o equilibrio biolóxico e evitar danos celulares. Estes antioxidantes sintéticos presentan vantaxes fronte aos naturais debido ás súas características, como o baixo peso molecular, e ao reducido coste de produción, polo que supoñen unha alternativa ao seu uso en terapias. Neste proxecto, sintetizouse un complexo metálico de manganeso a partir dun ligando base de Schiff obtido mediante a condensación de 1,2-diaminopropano e 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehido. A súa caracterización levouse a cabo mediante estudos de condutividade, espectroscopia IR, espectroscopia Ultravioleta-Visible, cristalografía de raios X e espectrometría de masas entre outras técnicas. Realizouse un estudo do seu potencial redox mediante ensaios de voltametría cíclica. A súa actividade catalítica como antioxidante avaliouuse mediante ensaios de peroxidase, catalase e catecol oxidase. Os estudos demostran a correcta obtención do complexo, unha elevada reversibilidade do proceso Mn(II)/Mn(III) e indican unha actividade catalítica alta o que confirma o papel mimético antioxidante.

Palabras clave: manganeso, antioxidante, complexo metálico, especies reactivas de osíxeno (ROS), catalase, peroxidase, catecol oxidase, biomimético, estrés oxidativo, base de Schiff.

NUEVOS CATALIZADORES BIOMIMÉTICOS DE MANGANESO: ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Resumen.

El manganeso es un metal esencial que participa en numerosos procesos biológicos. Está presente en el centro activo o actúa como cofactor de antioxidantes naturales. Por ello, el uso de complejos de manganeso presenta una potencial aplicación como un modelo biomimético de estas enzimas antioxidantes. La función de estas enzimas es neutralizar a las especies reactivas de oxígeno, fuertes oxidantes que causan el estrés oxidativo, para mantener el equilibrio biológico y evitar daños celulares. Estos antioxidantes sintéticos presentan ventajas frente a los naturales debido a sus características, como su bajo peso molecular, y a su reducido coste de producción, por lo que suponen una alternativa a su uso en terapias. En este proyecto, se sintetizó un complejo metálico de manganeso a partir de un ligando base de Schiff obtenido mediante la condensación de 1,2-diaminopropano e 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído. Su caracterización se llevó a cabo mediante estudios de conductividad, espectroscopía IR, espectroscopía Ultravioleta-Visible, cristalografía de rayos X y espectrometría de masas entre otras técnicas. Se realizó un estudio de su potencial redox mediante ensayos de voltametría cíclica. Su actividad catalítica como antioxidante se evaluó mediante ensayos de peroxidasa, catalasa y catecol oxidasa. Los estudios demuestran la correcta obtención del complejo, una elevada reversibilidad del proceso Mn(II)/Mn(III) e indican una actividad catalítica alta, lo que confirma su papel mimético antioxidante.

Palabras clave: manganeso, antioxidante, complejo metálico, especies reactivas de oxígeno (ROS), catalasa, peroxidasa, catecol oxidasa, biomimético, estrés oxidativo, base de Schiff.

NEW BIOMIMETIC MANGANESE CATALYSTS: STUDY OF THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITY.

Abstract.

Manganese is an essential metal which participates in numerous biological processes. It is part of the active site or acts as a cofactor of natural antioxidants. Hence, the application of manganese complexes shows potential as an antioxidant enzyme biomimetic model. The role of these enzymes is to neutralize reactive oxygen species, which are strong oxidants that cause oxidative stress, in order to maintain biological balance and avoid cellular damage. These synthetic antioxidants have advantages comparing them to natural antioxidants because of their characteristics, such as their low molecular weight and their low production costs. Therefore, they are an alternative to natural antioxidants therapy. In this project, we synthesized a metal manganese complex using a base Schiff ligand obtained by condensation of 1,2-diaminopropane and 2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde. The complex was characterized by conductivity studies, IR and ultraviolet – visible spectroscopies, X ray crystallography and mass spectrometry among other analysis. Its redox potential was tested by cyclic voltammetry. Its catalytic antioxidant activity was determined by peroxidase, catalase and catechol oxidase essays. The studies demonstrate the correct obtention of the manganosalen complex, a high rate of reversibility for the Mn(II)/Mn(III) process and relevant catalytic activities, which confirm its antioxidant mimetic role.

Keywords: manganese, antioxidant, metal complex, reactive oxygen species (ROS), catalase, peroxidase, catechol oxidase, biomimetic, oxidative stress, Schiff base.

1. Introducción

1.1. Estrés oxidativo e modelos biomiméticos.

Os antioxidantes xogan un papel fundamental nos organismos, protexendo ás células de danos producidos por especies reactivas de osíxeno (ROS) e radicais libres, coñecido como estrés oxidativo [1], o cal pode causar diferentes enfermidades neurolóxicas, como Alzheimer, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, e outras doenzas relacionadas co envellecemento [1,4]. A defensa antioxidante dos organismos componse de especies non encimáticas, como a vitamina E, a vitamina A ou o glutatión [2] e encimas que poden neutralizar ás ROS, entre os cales se atopan o catalase e o peroxidase [3], que a través dos procesos redox poden controlar o nivel de ROS e retrasan o envellecemento celular [4]. Algúns destes encimas presentan manganeso nos seus centros activos ou o utilizan como cofactor, polo que suxiren o uso de complexos metálicos con manganeso como un antioxidante biomimético que as segue como modelo (seméllase en estrutura e reactividade ao centro activo destes encimas) [3,5].

Os complexos sintéticos de baixo peso molecular xorden como modelos biomiméticos con vantaxes sobre a potencial administración de encimas antioxidantes nativos, pois estes vense suxeitos a diferentes limitacións [6] como pode ser a curta vida media destes encimas, a dificultade para penetrar nas células debido ao seu alto peso molecular, a antixenicidade ou os altos custos de produción.

Entre os modelos biomiméticos que se están a ensaiar destacan os complexos metálicos da familia manganosalen, con potencial actividade como miméticos da superóxido dismutase, glutatión peroxidase ou catalase [7-8]. O manganeso é un elemento cunha abundancia relativamente alta na codia terrestre (0.085 %), coa particularidade máis subliñable da súa ampla variedade de estados de oxidación formais, aínda que usualmente limita a súa aparición entre Mn^{2+} e Mn^{7+} . Entre estes, os ións +2, +3 e +4 son os máis empregados polos sistemas biolóxicos xa que os de estado de oxidación máis elevados son altamente oxidantes e desestabilizan aos ligandos orgánicos [9].

O manganeso nos estados de oxidación elevados actúa coma un forte ácido de Lewis, polo que prefire como ligantes doadores bases fortes, tales como hidróxidos ou óxidos, do tipo dos alcóxidos, fenóxidos e carboxilatos presentes nas cadeas proteicas. Pero tamén acepta outros doadores non tan fortes, particularmente en estados de oxidación inferiores, tal é o caso do nitróxeno ou do xofre.

O manganeso é un elemento imprescindible, a súa implicación esencial na oxidación fotosintética da auga xa fora observada por Pirson en 1937 [10] ao comprobar a perda da capacidade para producir O_2 polas plantas e algas privadas deste metal no seu medio de crecemento. A actividade redox do Mn estende a súa participación a outros encimas de subliñable importancia biolóxica, deste xeito atopámolo na superóxido dismutase, arxinase, catalase, glutatión peroxidase, ribonucleótido reductase, enolase e outros [11].

Os complexos de tipo manganosalen son compostos de coordinación que incorporan un ligando quelato base de Schiff con, alomenos, un xogo doador ONNO. Na Figura 1.1 recóllense algúns dos modelos biomiméticos de tipo manganosalen con actividade antioxidante e relevancia farmacolóxica. Os ligandos que se incorporan nestes complexos, con átomos doadores osíxeno e nitróxeno, teñen a capacidade de diminuír os potenciais redox do ión metálico ao coordinarse ($E^\circ = 1.51 \text{ V}$ para $[Mn(H_2O)_6]^{3+}$, un potencial bastante oxidante) e os complexos resultantes constitúen sistemas axeitados para catalizar diferentes reaccións redox [12].

Os potenciais redox dos complexos manganosalen poden modificarse segundo se varíen algunhas das características dos substituíntes dos ligandos. Por exemplo, os substituíntes alcoxi nos aneis aromáticos, en particular os grupos metoxi ou etoxi nas posicións 3 dos aneis, poden diminuír os potenciais redox dos complexos debido ao carácter doador electrónico deste tipo de substituíntes. Deste xeito, facilitaríase a obtención de estados de oxidación máis elevados para o manganeso durante a actividade encimática. Na literatura atópanse complexos manganosalen que difiren nuns 1000 mV no seu potencial para o proceso Mn(III)/Mn(II) [5, 13-15], con valores que van de -650 mV a +480 mV.

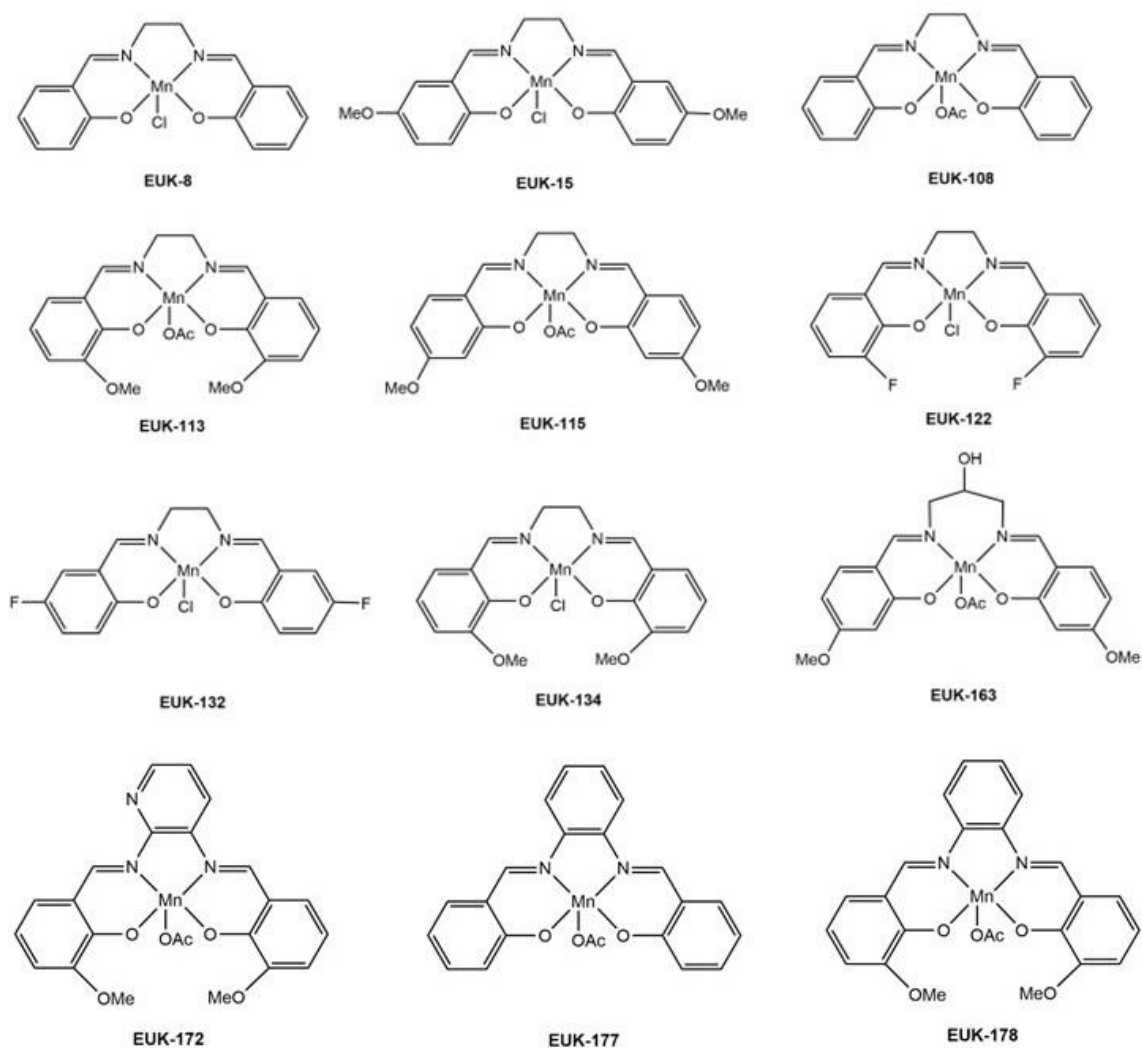


Figura 1.1. Estruturas dalgúns complexos manganosalen (cos acrónimos que habitualmente se utilizan na literatura para nomealos) con relevancia farmacolóxica.

Descríbóronse diferentes modelos artificiais de complexos de manganosalen con efectos neuroprotectores. Raber et al. [16] estudaron a capacidade dun dos compostos, denominado EUK-207, para mitigar os danos cognitivos inducidos pola radiación. Outro complexo de manganosalen, denominado EUK-189 e utilizado por Levine et al. [17], demostrou a capacidade de corrixir a anormalidade neurocondutual en ratos con ataxia-telangiectasia. Collins et al. [18] informaron da prolongación da supervivencia nun modelo murino de enfermidade priónica humana tratado con EUK-189. Outros estudos realizados por Melov et al. [19]

amosaron o rescate de ratos que carecían da forma mitocondrial da superóxido dismutase do proceso neurodaxenerativo oxidativo mediante o uso de diferentes complexos de manganosalen. Tamén se informou, por parte de diferentes autores, que estes compostos presentan efectos beneficiosos na prevención dos déficits cognitivos dependentes da idade [3].

1.2. Encima peroxidase.

O encima peroxidase encárgase de catalizar a redución do peróxido, un forte oxidante, a radicais hidroxilo e ións hidróxido [20]. Pode eliminar hidroperóxidos lipídicos que se forman en membranas neuronais con abundantes ácidos graxos poliinsaturados (ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, eicosapentaenoico) [3].

A peroxidase de manganeso (MnP) é unha proteína glicosilada composta por 357 aminoácidos. Foi descuberta nun fungo, *P. Chrysosporium*, capaz de degradar a lignina presente nas paredes celulares [21]. Presenta un grupo hemo pentacoordinado e dous dominios equivalentes con hélices maiores e menores dispostas de forma distal e proximal ao grupo hemo, que conteñen un átomo de calcio septacoordinado cada un. O átomo de calcio distal está ligado a aminoácidos da cadea (Asp,47, Ser66, Asp64, Gly62, Asp47) e dúas moléculas de auga. Concédelle estabilidade térmica ao encima. O Asp47 forma parte do centro activo e está conservado en numerosas peroxidases. A proteína contén cinco enlaces disulfuro, comúns a outras peroxidases con excepción do enlace Cys341-Cys348, que é exclusivo do MnP e estabiliza o extremo carboxilo terminal e o sitio de unión ao manganeso. O Asp242 forma un enlace de hidróxeno coa His173, resultando na diminución do potencial redox do ferro e facilitando a formación de intermediarios oxiferril [21].

O peroxidase precisa o Mn(II) como substrato, que será oxidado a Mn(III) e sairá do sitio de unión ao encima formando un complexo cun axente quelante. Normalmente o quelante é un ácido dicarboxílico, como malonato ou oxalato. Este complexo é un potente oxidante, que oxida aos grupos fenólicos libres do substrato

producindo un radical fenoxi intermediario. Posteriormente, volve ser oxidado polo Mn(III) para formar un catión centrado no carbono.

No ciclo catalítico (Figura 1.2), o encima é oxidado polo peróxido dando lugar ao composto oxiferril, mentres que o H₂O₂ será reducido a auga. O Mn(II) reduce este intermediario, oxidándose a Mn(III). Para volver a Mn(II) oxida a un substrato fenólico ou aromático. O segundo intermediario volve reducirse por acción do Mn(II), para volver ao estado férrico inicial e continuar o ciclo. En presenza de peróxido en exceso obtense outro composto en vez do encima inicial.

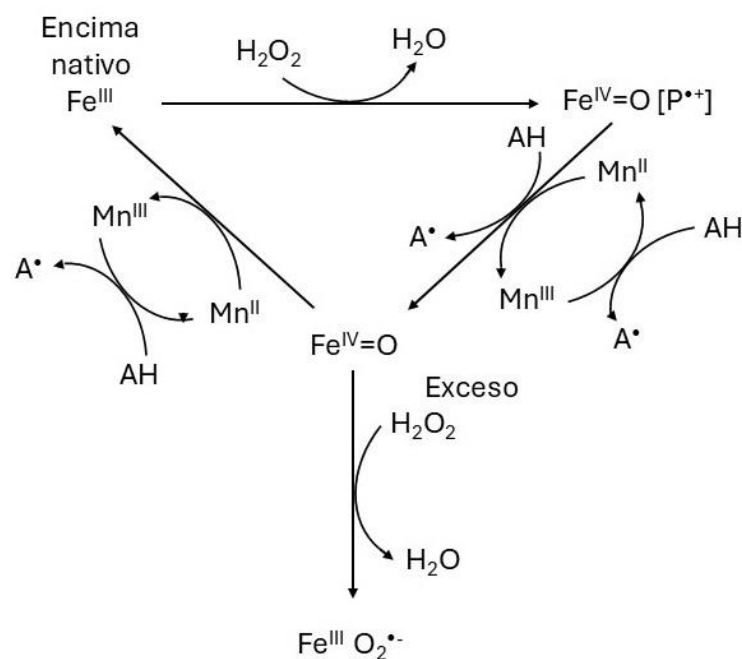
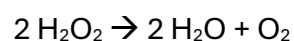


Figura 1.2. Esquema do ciclo catalítico dos peroxidases.

O glutatión peroxidase é unha clase de peroxidase presente nos humanos que cataliza a reacción de oxidación do glutatión a glutatión disulfuro, proceso ligado á redución do peróxido de hidróxeno a auga [22].

1.3. Encima catalase

O encima catalase cataliza a descomposición do peróxido de hidróxeno en osíxeno e auga:



Este proceso é termodinamicamente favorable, pero moi lento en ausencia de catalizador, o cal resultaría negativo para as células.

O catalase de manganeso, exclusivo de bacterias e arqueas, presenta un centro activo con dous núcleos de Mn(III) coordinados con dous osíxenos (Mn_2O_2) no interior dun dominio composto por 2 α -hélices antiparalelas en espiral [23]. Presenta glutamato e histidina como ligandos e ten unha xeometría octaédrica. Na sexta posición un derivado do disolvente ligase a un dos manganesos. A presenza de residuos doadores ou aceptores próximos ao sitio activo facilita a transferencia de protóns entre átomos non adxacentes no complexo e é esencial para unha catálise eficiente.

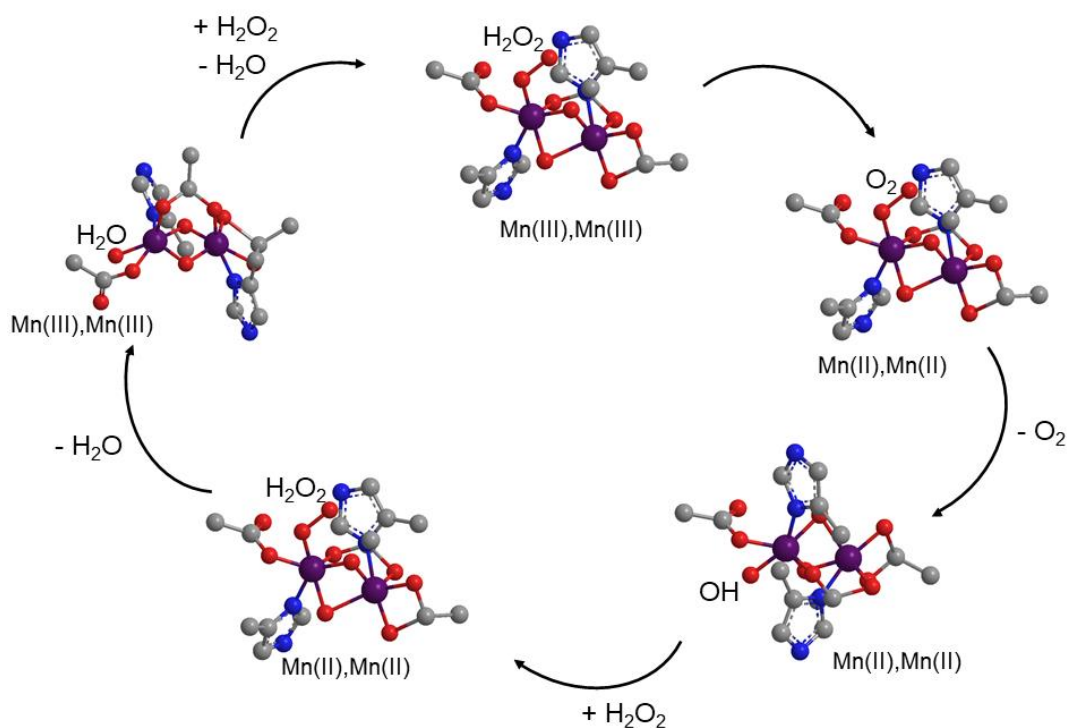
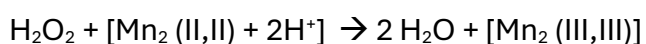
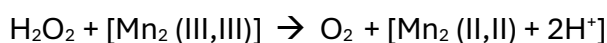


Figura 1.3. Mecanismo da actividade catalase para a desproporcionación do peróxido de hidróxeno no *Lactobacillus plantarum*.

O mecanismo de acción (Figura 1.3) baséase na catálise de dúas semireaccións nas que se reducen dúas moléculas de peróxido de hidróxeno a auga e osíxeno. Na primeira fase, unha molécula de peróxido coordínase a un dos manganesos do

centro catalítico (Mn1) desprazando ás moléculas do disolvente. O osíxeno que a compón será oxidado, xerando o diosíxeno, mentres que os átomos de manganeso do centro se reducen a Mn(II). Tras a saída do diosíxeno, unha segunda molécula de H₂O₂ enlaza co Mn1. Redúcese, rompendo así o enlace O-O e oxidándose os Mn a Mn III tras a protonación con perda de auga. A volta ao estado inicial permite continuar o ciclo catalítico [24].



O peróxido procede maioritariamente da reacción catalizada polo superóxido dismutase, na que o radical superóxido se converte en peróxido. O peróxido en si non é unha ROS, pero en presenza de ferro pode dar lugar ao radical hidroxilo, que é un oxidante moi potente e danoso. Pode participar en diversas rutas de sinalización como segundo mensaxeiro. En cantidades abundantes resulta negativo e pode relacionarse con cancro, envellecemento e procesos neurodexenerativos (Alzheimer, Parkinson, Huntington) [25]. Pode atravesar membranas celulares e causar estrés oxidativo en baixas concentracións en auga (a bacterias). Outra fonte de peróxido é a cadea de transporte electrónico mitocondrial do metabolismo aeróbico [25].

1.4. Encima catecol oxidase.

O encima catecol oxidase é unha proteína con actividade catalítica redox que ten a capacidade de unirse ao osíxeno de forma reversible a temperatura ambiente [26]. A cotío preséntase como unha proteína de cobre de tipo 3 e cataliza a oxidación de orto-difenois en orto-quinonas xunto coa redución do osíxeno molecular a auga. Na natureza, as quinonas formadas tenden a autopolimerizarse para xerar un pigmento polifenólico marrón, a melanina, nun proceso deseñado para protexer o tecido danado contra patóxenos ou insectos [27].

O catecol oxidase atópase en tecidos de plantas e en crustáceos. O seu peso molecular varía segundo a especie, aínda que se pode dividir en dous rangos, un que está entre 38-45 kDa e outro entre 55-60 kDa [28]. No seu ciclo catalítico (Figura 1.4) comeza no estado nativo do encima Cu(II)-Cu(II), que reacciona cun equivalente de catecol, dando lugar á formación da quinona e á forma reducida do encima Cu(I)-Cu(I). A continuación, unha molécula de diosíxeno enlázase ao centro activo desprazando unha molécula de disolvente unida ao Cu^IA, este diosíxeno pasará a actuar como ligando ponte entre os dous centros metálicos á vez que se coordina unha segunda molécula de catecol. Neste modelo, CuB pasará a unha hexacoordinación mentres o CuA mantén a xeometría pirámide tetragonal, con diosíxeno, His88 e His118 nas posicións ecuatoriais, His109 nunha das posicións axiais e cunha vacante na sexta posición de coordinación. O ciclo péchase coa transferencia de dous electróns do substrato ao peróxido, rotura do enlace O-O, perda da auga e a formación do produto da quinona e a recuperación da forma nativa do encima Cu(II)-Cu(II).

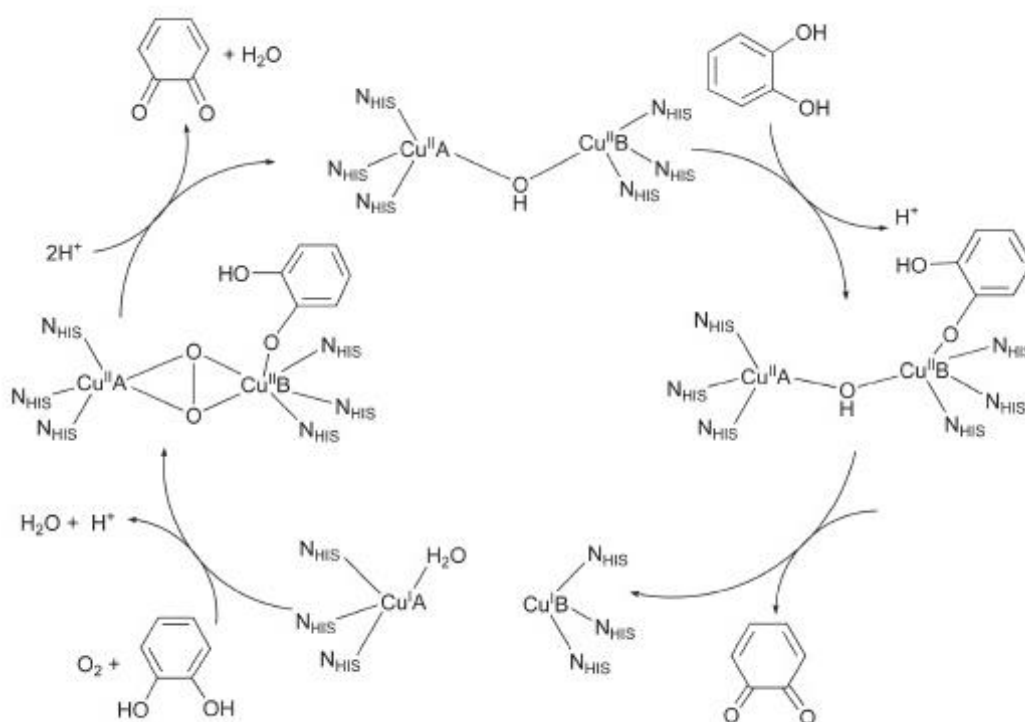


Figura 1.4. Ciclo catalítico do catecol oxidase da *Ipomoea batatas*. Dúas moléculas de catecol son oxidadas, un proceso ligado coa redución de osíxeno molecular a auga.

Aínda que nos catecol oxidases naturais o ión metálico do centro activo é cobre, téñense desenvolto modelos artificiais que reproducen a química redox deste tipo de encimas con outros ións metálicos, como pode ser o manganeso [29-30].

2. Obxectivos.

O obxectivo principal do proxecto é o desenvolvemento dun novo modelo de catalizador biomimético para diferentes procesos redox e a determinación da súa actividade en diferentes ensaios como mimético de distintos encimas. Para elo establécense os seguintes obxectivos específicos:

- Síntese e caracterización por diferentes técnicas dun novo complexo de manganeso con potencial capacidade como modelo de distintos encimas redox.
- Determinación da actividade redox do complexo obtido.
- Avaliación da actividade peroxidase, catalase e catecol oxidase do complexo obtivo.
- Avaliación da cinética da reacción como mimético da catecol oxidase para determinar as K_{obs} e a K_M do proceso catalítico.

3. Material e Métodos.

3.1. Disolventes e reactivos.

Os disolventes utilizados son:

· Acetonitrilo (CH_3CN): $D = 0,786 \text{ g/cm}^3$, $M_m = 41,05 \text{ g/mol}$. Pureza: 99,9%. Marca: Scharlau. Empregado como disolvente en probas de solubilidade e en recristalizaciones.

· Cloroformo deuterado (CDCl_3). $M_m = 120,38 \text{ g/mol}$. Pureza: 99,8%. Marca: Aldrich. Empregado como disolvente para o rexistro dos espectros de RMN de ^1H .

· Dimetilformamida ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$): $D = 0,948 \text{ g/cm}^3$, $M_m = 73,10 \text{ g/mol}$. Pureza: 99,8%. Marca: Panreac. Empregado como disolvente en probas de solubilidade.

· Dimetilsulfóxido (DMSO) ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$): $D = 1,10 \text{ g/cm}^3$, $M_m = 78,13 \text{ g/mol}$. Pureza: 99,9%. Marca: Scharlau. Empregado como disolvente en probas de solubilidade e nos estudos de voltametría cíclica.

· Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$): $D = 0,79 \text{ g/cm}^3$, $M_m = 46,07 \text{ g/mol}$. Pureza: 99,5%. Marca: Panreac. Empregado como disolvente en probas de solubilidade, en ensaios de actividade catalítica e en recristalizaciones.

· Éter dietílico ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$): $D = 0,715 \text{ g/cm}^3$, $M_m = 74,12 \text{ g/mol}$. Pureza: 99,5%. Marca: Panreac. Empregado como disolvente no lavado dos compostos.

· Metanol (CH_3OH): $D = 0,79 \text{ g/cm}^3$, $M_m = 32,04 \text{ g/mol}$. Pureza: 98%. Marca: Scharlau. Empregado como disolvente na síntese do complexo metálico, en probas de solubilidade, en ensaios de actividade catalítica e en recristalizaciones.

· Triclorometano (CHCl_3): $D = 1,48 \text{ g/cm}^3$, $M_m = 119,38 \text{ g/mol}$. Pureza: 99%. Marca: Panreac. Empregado como disolvente na síntese da base de Schiff.

Os reactivos usados son:

· Acetato de Mn (II) tetrahidratado ($\text{C}_4\text{H}_6\text{MnO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$): Estado sólido. $M_m = 245,09 \text{ g/mol}$. Pureza: 99%. Marca: Fluka.

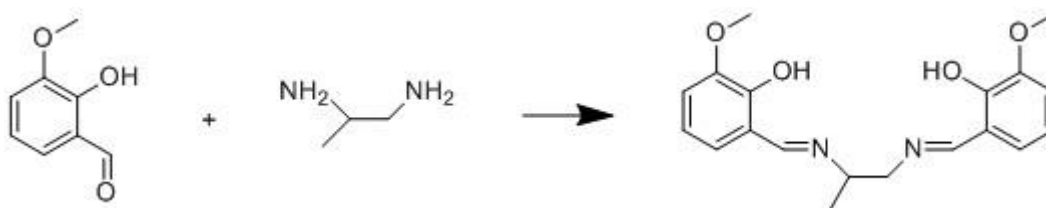
· Argon: Estado gasoso. Pureza: 99,999%. Marca: Praxair.

- Perclorato de tetraetilamonio ($C_8H_{20}ClNO_4$): Estado sólido. Mm = 229,70 g/mol. Pureza: 99%. Marca: Fluka.
- Peróxido de hidróxeno 30 % (H_2O_2): Estado líquido. D = 1,11 g/cm³, Mm = 34,01 g/mol. Marca: Panreac.
- Sal diamónica do ácido 2,2'- azinobis-(3- etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) ($C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$): Estado sólido. Mm = 348,68 g/mol. Pureza: 99%. Marca: Fluka.
- 1,2 – diaminopropano ($CH_3CH(NH_2)CH_2NH_2$): Estado líquido. D = 0,870 g/cm³, Mm = 74,13 g/mol. Pureza: 99%. Marca: Aldrich.
- 2 - hidroxí – 3 – metoxibenzaldehído ($C_8H_8O_3$): Estado sólido. Mm = 152,15 g/mol. Pureza: 97%. Marca: Aldrich.
- 3,5 – Di – tert – butil - catecol (DTBC) ($[(CH_3)_3C]_2C_6H_2-1,2-(OH)_2$): Estado sólido. Mm = 222,32 g/mol. Pureza: 98%. Marca: Sigma-Aldrich.

3.2. Síntese de compostos.

3.2.1. Síntese do ligando.

A base de Schiff H_2L obtense condensando un salicilaldehído e etilendiamina para dar N,N-bis(salicilideno)etilendiamina. Neste caso, os reactivos utilizados son o 1,2-diaminopropano e o 2-hidroxí-3-metoxibenzaldehído.



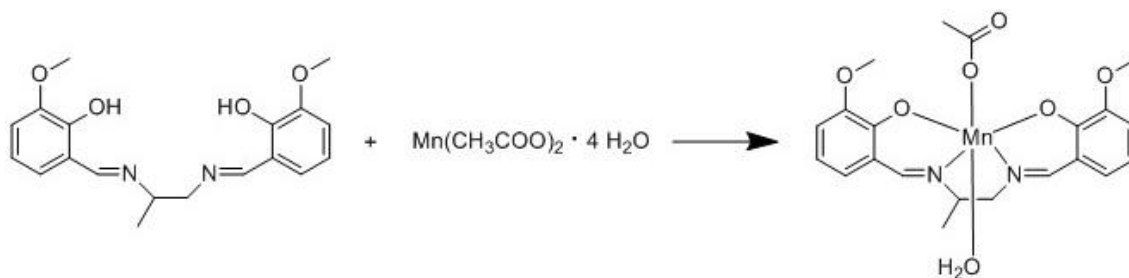
Pésanse 0,70 g de 2-hidroxí-3-metoxibenzaldehído (4,60 mmol) nunha balanza e disólvense nun balón con 50 mL de triclorometano. Engádense 0,196 mL (196 μ L, 2,30 mmol) de 1,2-diaminopropano e obsérvase un cambio de cor a amarelo intenso. O balón ponse en refluxo cun Dean - Stark, con calor e axitación durante dúas horas. Para facilitar a transmisión de calor, tápase o balón con papel de aluminio e colócase nun soporte metálico. Deste xeito, retírase a auga formada na reacción de síntese e favorécese o proceso.

Unha vez a columna do Dean - Stark está chea, aproximadamente aos 40 minutos, desbótase o contido. Unha hora e media despois, obsérvase unha gota na columna que se corresponde coa auga, que foi arrastrada polo cloroformo ao evaporarse. Vólvese baleirar a columna. Hai que ter en conta que debe permanecer disolvente no balón durante todo o proceso.

Posteriormente, evapórase o cloroformo remanente no rotavapor e obtense un sólido amarelo. Fíltrase ao baleiro. Para axudar a retirar os restos da parede do balón engádese o éter dietílico. O produto seco recóllese nun recipiente etiquetado. O peso do ligando obtido é de 0,694 g, supoñendo un rendemento do 88%.

3.2.2. Síntese do complexo metálico MnL(OAc)(H₂O).

Para sintetizar o complexo metálico, pésanse 0,40 g (1,168 mmol) do ligando e disólvense en 40 mL de metanol en axitación nun vaso de precipitados. Pésanse 0,286 g (1,168 mmol) de acetato de Mn (II) tetrahidratado, que se engaden no vaso de precipitados en axitación unha vez o ligando estea disolto. Obsérvase un cambio de cor amarela a marrón rapidamente. Mantense en axitación durante dúas horas.



Ao remate das dúas horas, fíltrase ao baleiro e o líquido filtrado bótase nun cristalizador. Así evapórase o disolvente e o produto precipita.

Pasados uns días, lávase o cristalizador con éter dietílico e fíltrase de novo ao baleiro. O sólido seco pésanse e gárdase nun recipiente etiquetado. O seu peso é de 0,5317 g, supoñendo un rendemento do 92,83%.

O complexo recristalízase en diferentes disolventes (dimetilformamida, metanol, etanol e acetonitrilo) co obxectivo de obter cristais axeitados para realizar estudos de cristalografía mediante difracción de raios X.

3.3. Técnicas experimentais.

3.3.1. Análise elemental.

Con esta técnica determínanse as porcentaxes de carbono, hidróxeno e nitróxeno do complexo preparado, para intentar establecer unha fórmula teórica que se axuste aos datos experimentais. Esta técnica de análise realízase nun analizador Carlo Erba Model 1108 CHNS-O.

3.3.2. Determinación dos puntos de fusión.

Séguese o método dos tubos capilares, nos que se introduce unha pouca mostra de ligando e de complexo. O tubo capilar introdúcese no equipo GallemKamp, modelo MPD350.BM3.5, no que a temperatura vai aumentando paulatinamente ata que o produto se funde. O valor obtido para cada composto pódese comparar cos rexistros bibliográficos.

3.3.3. Medidas espectrofotométricas no infravermello.

Os espectros infravermellos do ligando e complexo mídense nun espectrofotómetro JASCO FT/IR – 4600 na rexión comprendida entre os 4000 e os 400 cm^{-1} . As intensidades das bandas asígnanse da seguinte maneira: d= débil, m= media, f=forte e mf= moi forte.

3.3.4. Medidas da condutividade.

Para a análise da condutividade eléctrica do complexo utilízanse disolucións do complexo en auga destilada, metanol, etanol e DMSO cunha concentración de $1 \cdot 10^{-3}$ M. O equipo usado é o condutímetro CRISON EC-METER GLP31+. Tras calibrar o instrumento con disolucións calibradoras introdúcese o electrodo na disolución co complexo e realízase a medida. É necesario que nos disolventes usados o complexo sexa soluble.

3.3.5 Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear.

Os espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H rexístranse nun espectrómetro Bruker DRX-500. As mostras son disoltas en cloroformo deuterado, empregando TMS como referencia interna.

3.3.6. Espectroscopia Ultravioleta - Visible (UV-vis).

Os espectros realízanse nun espectrofotómetro Varian modelo Cary 50. Rexístranse os espectros do ligando e do complexo en disolucións $1 \cdot 10^{-5}$ M e $1 \cdot 10^{-4}$ M, respectivamente, en etanol e metanol nun rango de 280 a 900 nm. Esta técnica tamén se utiliza para determinar a estabilidade do complexo en diferentes disolventes e para os estudos de actividade peroxidase e catecol oxidase. Para medir a estabilidade do complexo, realízanse espectros durante unha hora cada 5 min. As concentracións son as xa indicadas para evitar que se sature e que estea por enriba do límite de detención.

3.3.7. Espectrometría de masas.

O espectro de masas electrospray realizouse nun aparato Micromass Autospec con alcol 3-nitrobencílico como matriz.

3.3.8. Cristalografía de Raios X.

Para a resolución cristalina de $\text{MnL}(\text{OAc})(\text{H}_2\text{O})$ utilízase un difractómetro Bruker APPEX-II CCD que utiliza radiación $\text{Mo-K}\alpha$ ($\lambda = 0.7107 \text{ \AA}$) a 100 K. Os datos informáticos e a redución realízanse co software Bruker SAINT (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Alemaña) [31] e a corrección de absorción empírica co programa SADABS [32].

A estrutura resólvese mediante SIR-97 [33] e refínase mediante técnicas de mínimos cadrados de matriz completa F2 usando SHELXL-97 [34]. Os parámetros de desprazamento atómico posicional e anisotrópico son refinados para todos os heteroátomos. As posicións dos átomos de hidróxeno inclúense no modelo por densidade electrónica e refínanse isotrópicamente. As estruturas represéntanse co programa Mercury [35].

3.3.9. Estudo da voltametría cíclica.

O comportamento redox do complexo metálico estúdase mediante experimentos de voltametría cíclica empregando un potenciostato Metrohm Autolab PGSTAT101 cunha configuración de tres electrodos nunha disolución do complexo de concentración 10^{-3} M en dimetilsulfóxido (DMSO) e perclorato de tetrabutilamonio como electrólito condutor. O electrodo de traballo utilizado é o modelo Metrohm 6.1204.000 de disco de grafito, como electrodo de referencia úsase un Metrohm 6.0728.000 de Ag/AgCl en KCl 3M, mentres que como electrodo auxiliar utilízase un fío de platino. As disolucións son desosixenadas antes de cada experimento burbulleando argon. O electrodo de disco de grafito púlese antes de cada experimento cun kit de pulido (Metrohm 6.2802.010), primeiro con $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ e posteriormente lávase con auga destilada. Rexístranse os voltamogramas a diferentes velocidades de varrido.

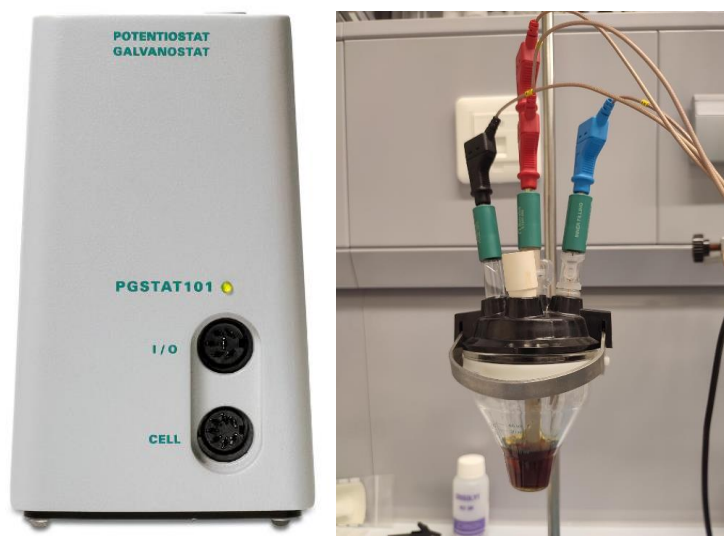
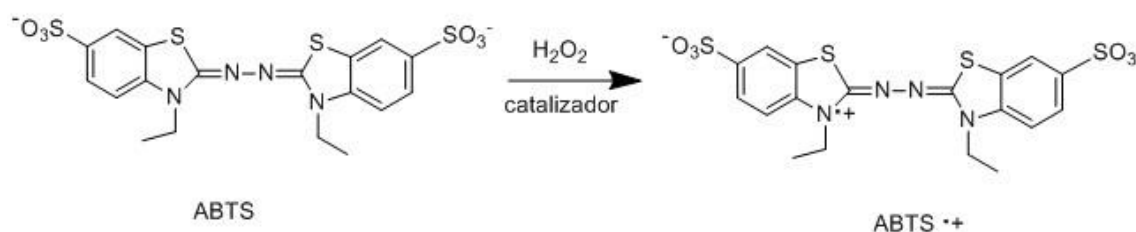


Figura 3.1. Potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT101 (esquerda) e electrodos (dereita).

3.4. Estudos de actividade mimética de diferentes encimas antioxidantes.

3.4.1. Estudo da actividade catalítica como peroxidase.

Determinase a capacidade do complexo de manganeso para catalizar a descomposición do peróxido de hidróxeno en auga e osíxeno. Como indicador emprégase o ABTS, que será oxidado a $ABTS^{\cdot+}$ conforme avance a reacción. O radical $ABTS^{\cdot+}$ é de cor verde e absorbe no espectro ultravioleta – visible, presentando catro bandas de absorción características, tres pouco intensas a 650, 735 e 815 nm, e unha máis intensa a 415 nm. A reacción monitorízase, polo tanto no espectrofotómetro Cary 50.



Para realizar este estudo bótanse nunha cubeta 0,05 mL dunha disolución 0,009M de ABTS en auga destilada ($4,50 \cdot 10^{-7}$ moles), 0,01 mL dunha disolución $1 \cdot 10^{-3}$ M do complexo en metanol ($1 \cdot 10^{-8}$ moles) e 3 mL de auga destilada. Posteriormente, engádense 0,05 mL do H_2O_2 cunha concentración de 10 M ($5 \cdot 10^{-4}$ moles), adquirindo unha cor verde a disolución, e iníciase a medición. Mídese cada 10s durante 5 min.

Previamente, rexístranse dous brancos seguindo o proceso descrito anteriormente. Neste caso, introdúcese nunha cubeta 50 μ L dunha disolución acuosa de ABTS 0,009 M, 0,05 mL de H_2O_2 10 M e 3 mL de auga destilada, sen que se observe ningunha variación na cor. Tamén se realiza outra medida introducindo na cubeta 0,05 ml da disolución acuosa de ABTS 0,009M, 0,01 ml da disolución metanólica 10^{-3} M do complexo e 3 ml de auga destilada, sen que se produza ningunha actividade catalítica.

Séguese o mesmo procedemento para realizar o estudo en etanol.

3.4.2. Estudo da actividade catalítica como catalase.

Para medir a actividade catalase é preciso facer unha montaxe experimental, a cal consta dunha probeta graduada de 10 mL onde se introducen 3 mL da disolución do complexo 10^{-3} M ($3 \cdot 10^{-6}$ mol) e unha barra axitadora, sélase a probeta cun tapón séptum o cal se cubre cun film e graxa para que non haxa ningunha posibilidade de perda de gas e ponse sobre unha placa magnética a axitar. Cando a probeta estea ben selada, conéctase a unha probeta graduada invertida de 25 mL que se introduce nun cristalizador con auga no límite da auga.

A catálise comeza coa introdución dunha disolución de H_2O_2 (1mL, 2,5 M) cunha xiringa na probeta que contén o complexo (a través do séptum) e que está inserida nun capilar que ten o outro extremo introducido na probeta invertida.

Unha vez inxectado o peróxido, cóbrese de graxa e con filme para que quede perfectamente selado. Durante este proceso a disolución está cunha axitación constante e vaise medindo cada 2 minutos a evolución do dióxixeno de maneira volumétrica. A medición de osíxeno pódese facer cada 5 minutos a partir do minuto 10 e mantense ata os 45 minutos.

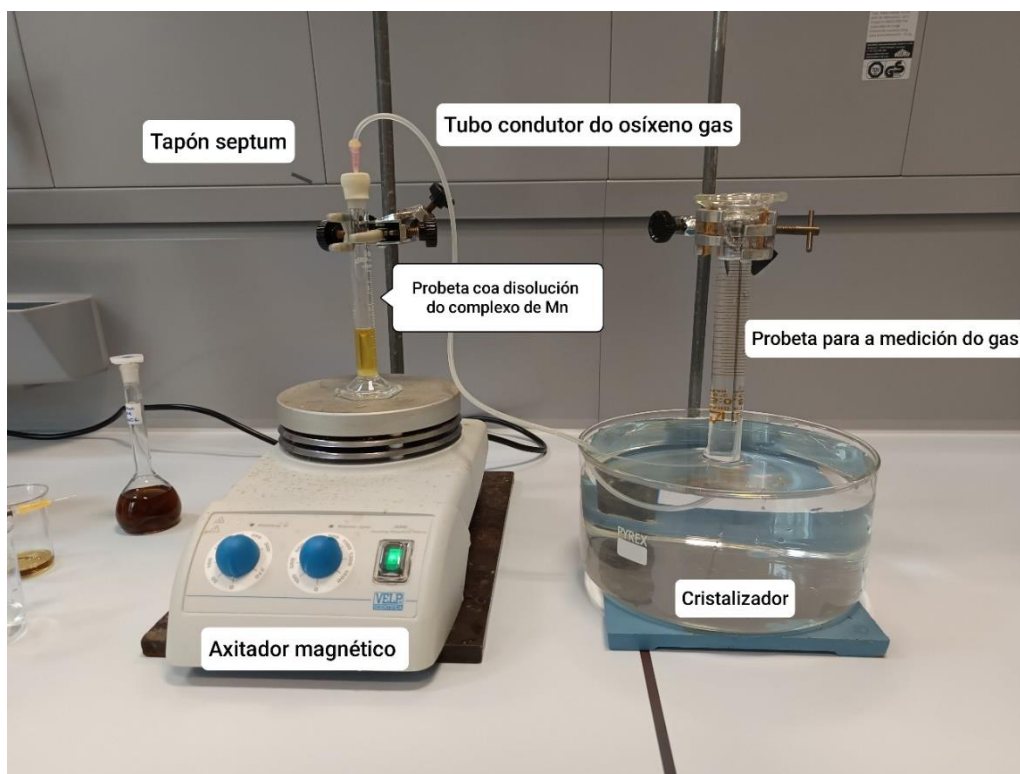
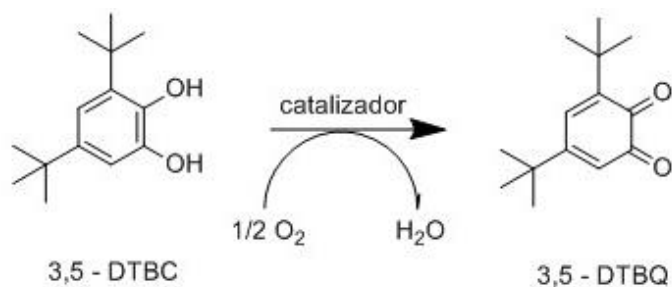


Figura 3.2. Montaxe empregada no estudo da actividade catalase.

3.4.3. Estudo da actividade catalítica como catecol oxidase.

Para avaliar a actividade tipo catecol oxidase do complexo emprégase 3,5-DTBC (3,5-ditert-butilcatecol) como substrato, que será oxidado a o-quinona (3,5-DTBQ), e unha disolución de complexo en metanol. O 3,5- DTBQ presenta un pico máximo de absorción a 401 nm en metanol [36-37].



Prepáranse disolucións metanólicas do complexo ($1 \cdot 10^{-4}$ M) e de 3,5-DTBC ($1 \cdot 10^{-2}$ M) que se introducen na cubeta en distintas proporcións segundo corresponda, para realizar a medida a 100, 200, 500 e 1000 equivalentes. A reacción monitorízase por espectroscopia UV- visible no espectrofotómetro Cary 50 nun rango entre 300 e 800 nm. Mídese durante 130 minutos cada 5 minutos.

4. Resultados e Discusión.

4.1. Síntese e caracterización dos compostos.

4.1.1. Síntese e caracterización de H₂L.

A base de Schiff H₂L foi obtida como se describe no apartado 3.1 desta memoria. Trátase dun composto orgánico que xa fora previamente sintetizado e caracterizado no seo do grupo de investigación no que se realizou este traballo fin de grao [38-39], polo que, neste TFG, unha vez realizada a súa síntese de novo, só se comprobou a súa formación e pureza mediante a determinación do seu punto de fusión (136,7 °C) e coa realización dos espectros IR e de RMN de ¹H. Os resultados obtidos mediante estas técnicas confirman a obtención do composto.

En relación coa espectroscopia infravermella (Figura 4.1) hai que resaltar a formación da banda debida á tensión do grupo C=N que se sitúa a 1626 cm⁻¹ e a banda correspondente ao grupo C-O a 1251 cm⁻¹. A posición destas bandas coincide coa xa descrita na bibliografía [38-39].

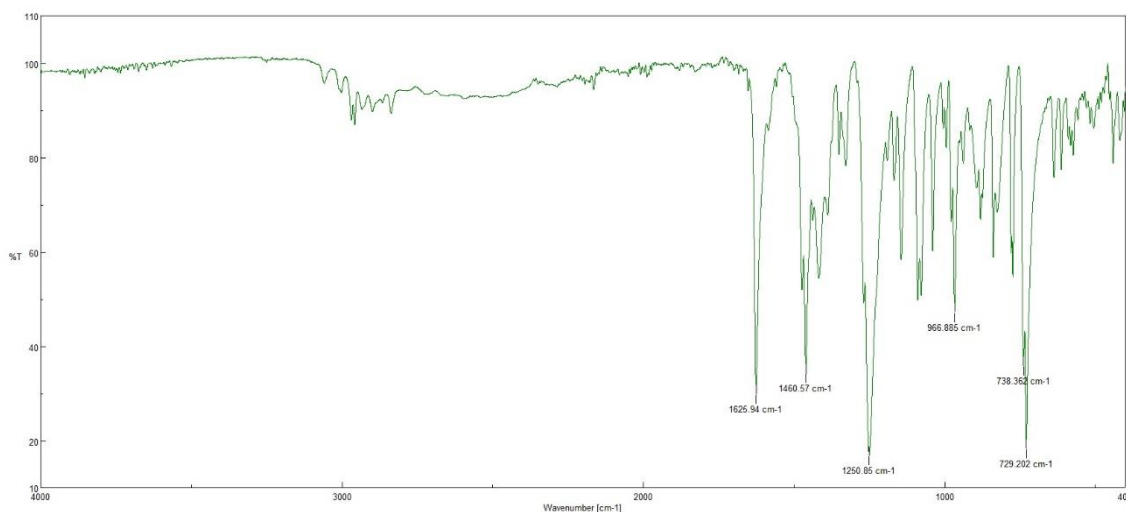


Figura 4.1. Espectro infravermello do ligando H₂L.

En canto á espectroscopia de RMN de ¹H, identifícase no espectro (Figura 4.2) a formación do enlace imino (H_E na Figura 4.3) coa aparición de dous sinais singuleto a 8,54 e 8,57 ppm. A razón destes dous sinais explícase pola asimetría do composto que provoca que os dous protóns imínicos non sexan exactamente equivalentes

[38,40]. No espectro tamén se comproba que se produciu a condensación entre o aldehído e a amina pola desaparición dos sinais dos seus protóns característicos a 10 a 11 ppm respectivamente.

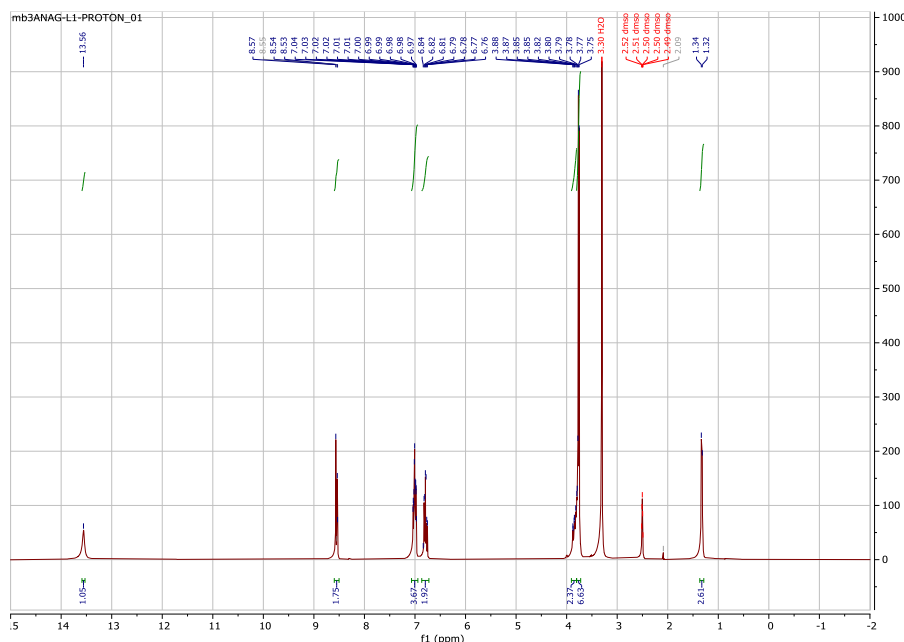


Figura 4.2. Espectro de RMN de ^1H do ligando H_2L .

Outros sinais do espectro de RMN de ^1H son:

- Un singuleto ancho a 13,56 ppm correspondente aos hidróxenos fenólicos (H_G). O comportamento deste sinal é en parte debido aos intercambios cos protóns do disolvente.

- Un duplete cunha constante de ligamento moi pequena a 1,32-1,34 ppm, que corresponde aos hidróxenos do grupo metilo indicados como H_B na Figura 4.3.

- Un multiplete, que non aparece ben definido, a 3,78-3,88 ppm correspondente a H_C que se liga cos H_B de CH_3 dando un cuarteto e cos H_D xerando un triplete.

- Un duplete no entorno de 3,78-3,88 ppm, que non aparece ben definido, correspondente aos H_D que se ligan co H_C .

- Un singuleto a 3,75 ppm correspondente aos H_A .

-Os protóns aromáticos H_F aparecen entre 6,76-7,04 ppm en forma de triplete a 6,87 ppm e dous dupletos a 6,99 e 7,02 ppm.

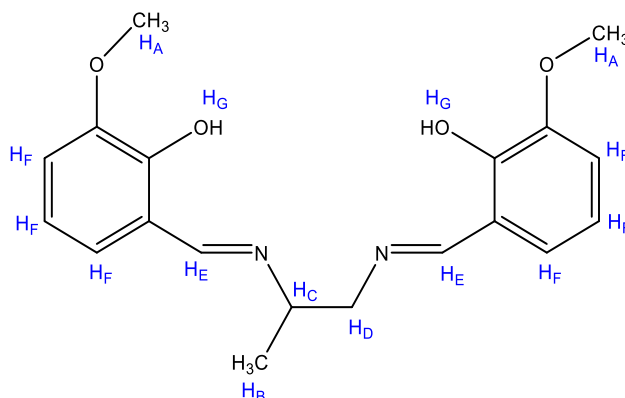


Figura 4.3. Estrutura de H_2L resaltando os diferentes tipos de protóns que se discuten na espectroscopia de RMN de 1H .

4.1.2. Síntese e caracterización do complexo metálico.

4.1.2.1. Análise elemental, punto de fusión, solubilidade e condutividade.

O complexo metálico foi caracterizado por distintas técnicas experimentais. Os resultados de análise elemental foron %C, 52,9; % N, 5,9; % H, 5,2, e son coherentes cunha formulación $MnL(OAc)(H_2O)$, con datos teóricos para $C_{21}H_{25}MnN_2O_7$ (472,4 g/mol): % C, 53,4; % N, 5,9; % H, 5,3. Esta fórmula implica a formación dun composto neutro, o cal está en concordancia coas medidas de condutividade obtidas en diferentes disolventes (Táboa 4.1), que indican unha natureza de non electrolito para este composto [41].

| Disolvente | Medida da condutividade ($\mu S / cm$) |
|------------|--|
| Metanol | 62,35 |
| Etanol | 26,50 |
| DMSO | 19,00 |

Táboa 4.1. Medidas de condutividades para disolucións $10^{-3} M$ do complexo $MnL(OAc)(H_2O)$ en diferentes disolventes.

O punto de fusión do complexo é superior aos 300°C. O complexo presenta boa solubilidade en todos os disolventes. Non é necesario axitar para facilitar a súa disolución. Aínda así, é máis soluble na dimetilformamida. Ordenando por solubilidade nos disolventes quedaría: dimetilformamida > metanol > etanol > auga > acetonitrilo.

4.1.2.2. Espectroscopia infravermella.

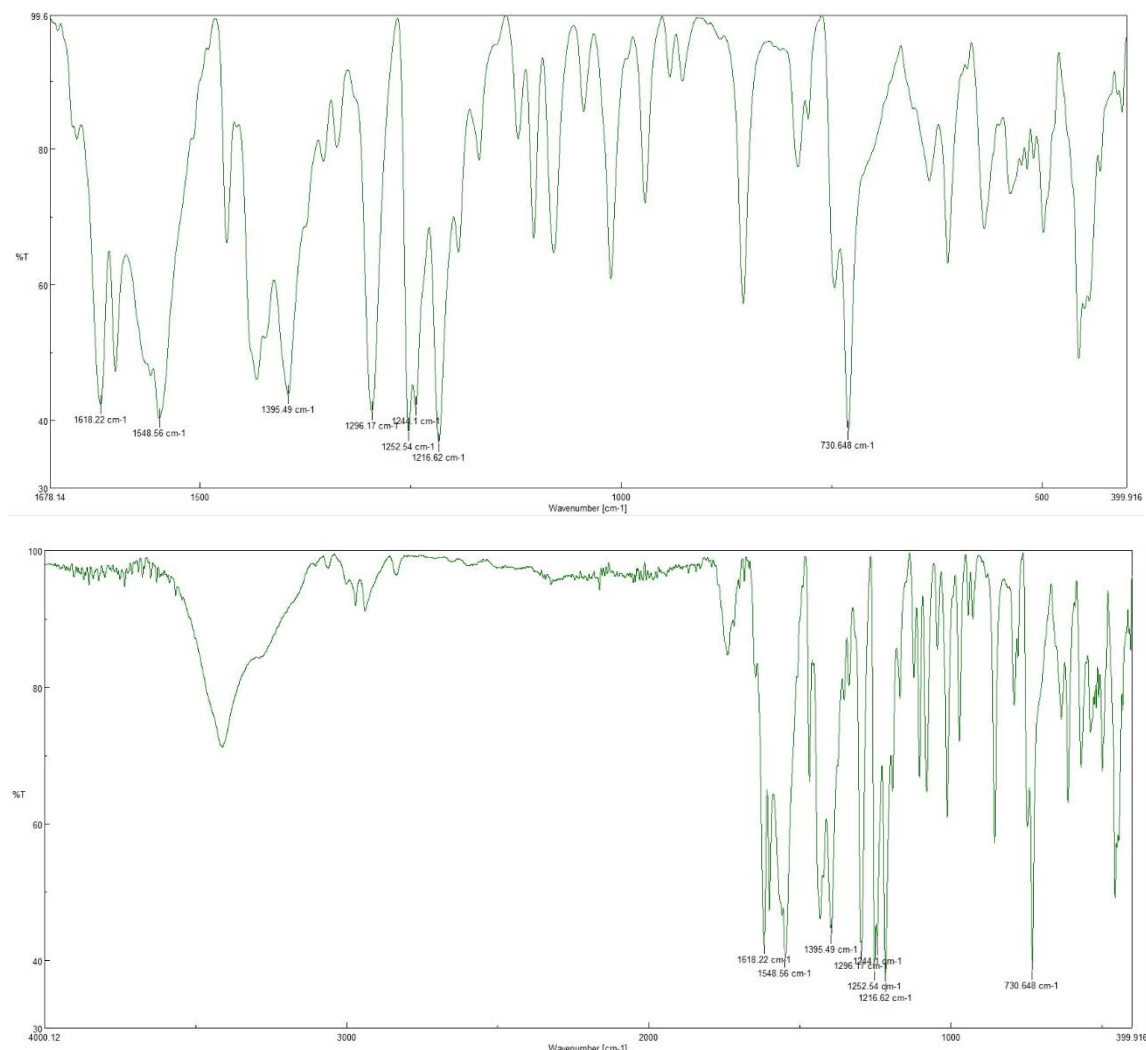


Figura 4.4. Espectro infravermello do complexo metálico $MnL(OAc)(H_2O)$.

As rexións máis útiles do espectro infravermello (Figura 4.4) son aquelas que se ven afectadas pola interacción entre a base de Schiff e o manganeso. Do estudo comparativo entre o espectro do ligando e do complexo debemos subliñar:

- Pódese observar unha banda ancha na rexión de 3400 cm^{-1} que indica a presenza de molécula de auga no complexo.

- b) A banda asignada á vibración $\nu(\text{C}=\text{N})$ aparece desprazada no complexo uns 8 cm^{-1} cara a números de onda máis baixo, ao pasar de 1626 cm^{-1} do ligando libre a 1618 cm^{-1} no complexo. Este feito confirma a coordinación do ligando ao metal a través do nitróxeno imínico [42].
- c) O modo de tensión $\nu(\text{C}-\text{O})$ aparece no complexo a 1252 cm^{-1} e atópase desprazado a un valor lixeiramente máis alto con respecto ao ligando libre, o que se interpreta como que o metal se enlaza ao osíxeno fenólico [39].
- d) Aparecen dúas novas bandas con respecto ao ligando libre, a 1549 e 1395 cm^{-1} , que poden asignarse aos modos asimétrico e simétrico de estiramento do grupo acetato [43].

4.1.2.3. Espectroscopia ultravioleta-visible.

O espectro electrónico do complexo metálico (Figura 4.5) é coherente co previsto para un complexo de Mn(III), sistema d^4 , nun contorno octaédrico de alto espín que probablemente sofra unha distorsión Jahn-Teller. Obsérvase certo desdoblamento da banda a 310-335 nm que pode ser causada por unha redución na simetría (de O_h a D_{4h}). Unha banda ancha a 440 nm atribúese a un proceso de transferencia de carga do fenonato ao Mn(III) [44].

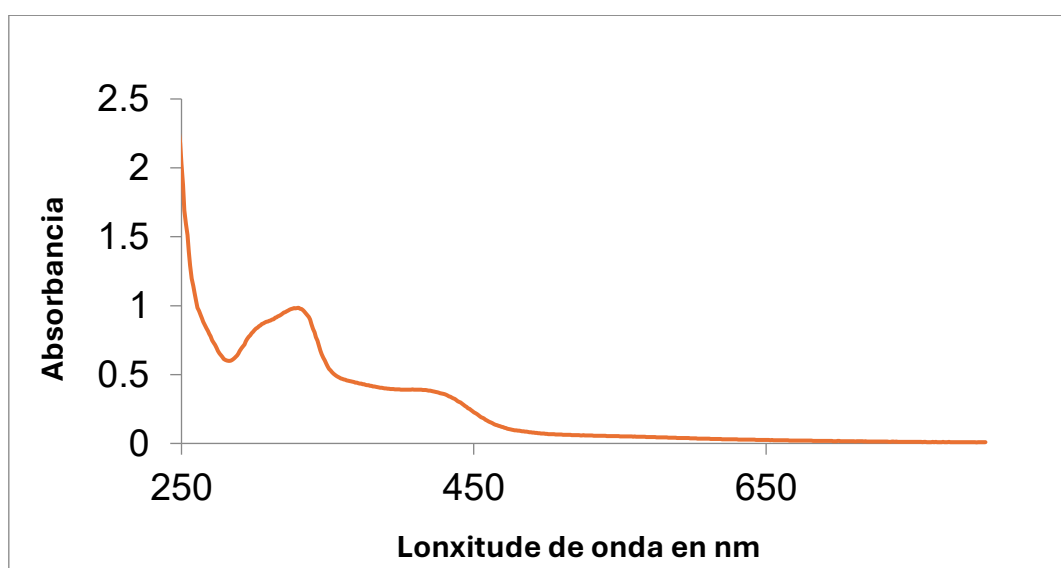


Figura 4.5. Espectro UV-Vis do complexo metálico $\text{MnL}(\text{OAc})(\text{H}_2\text{O})$ 10^{-4}M en metanol.

Non se observan cambios no espectro UV-Vis ao longo do tempo polo que podemos concluír que o complexo é estable.

4.1.2.4. Espectrometría de masas.

A espectrometría de masas ESI-MS (Figura 4.6) confirma a coordinación do ión metálico á base de Schiff cun pico a 395 m/z que corresponde con $[\text{MnL}]^+$.

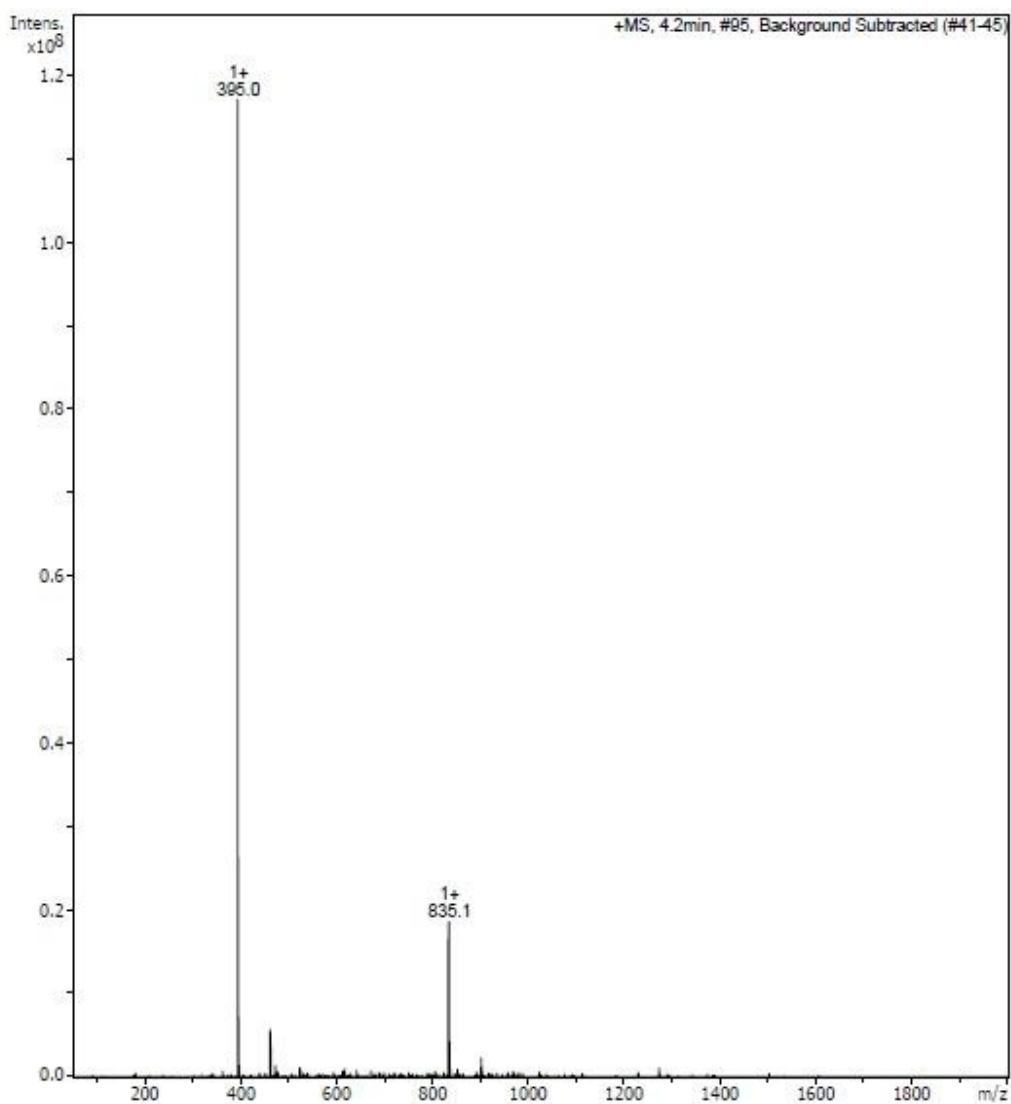


Figura 4.6. Espectro ESI-MS do complexo metálico $\text{MnL}(\text{OAc})(\text{H}_2\text{O})$.

4.1.2.5. Cristalografía de Raios X.

Durante o proceso de recristalización do complexo metálico obtéñense cristais aptos para a súa resolución por difracción de Raios X. Tanto a toma de datos cristalográficos como a súa resolución realizouse no servizo de raios X da Área de Infraestruturas de Investigación da USC, utilizando un difractómetro BRUKER APPEX-II CCD cunha radiación Mo-K α a unha temperatura de 100 K. A táboa 4.2 recolle os datos cristalográficos e os detalles experimentais desta técnica.

| | |
|----------------------------|---|
| Fórmula empírica | C ₂₁ H ₂₅ Mn N ₂ O ₇ |
| Peso molecular | 472,37 g/mol |
| Lonxitude de onda | 0,71073 Å |
| Sistema Cristalino | Triclínico |
| Grupo espacial | P -1 |
| Dimensións da cela unidade | a = 10,7473(5) Å α = 94,662(3)° b = 11,7269 (5) Å β = 97, 797 (2)° c = 11,9782(5) Å γ = 104,131(2)° |
| Volume | 2442,18(12) Å ³ |
| Z | 4 |
| Densidade (calculada) | 1,410 Mg/m ³ |
| Coeficiente de absorción | 0,684 mm ⁻¹ |
| F(000) | 524 |
| Reflexións tomadas | 25222 |
| Reflexións independentes | 6512 |
| Índices R Finais | R1 = 0,0383, wR2 = 0,141 |
| Índices R (todos os datos) | R1 = 0,0641, wR2 = 0,143 |
| Amplitude de varrido | 1,86 a 25,65° |

Táboa 4.2. Datos cristalográficos do complexo [MnL(CH₃COO)(H₂O)].

Como se observa na figura 4.7, no complexo o Mn(III) presenta unha xeometría octaédrica distorsionada (índice de coordinación 6) ao redor do átomo central. No plano ecuatorial sitúase o ligando que actúa como dianiónico e tetradentado, cun entorno de coordinación N_2O_2 (dous osíxenos fenólicos e dous nitróxenos imínicos) unidos ao átomo de manganeso, e completando a súa coordinación, nas posicións axiais sitúanse unha molécula do ión acetato e unha molécula de auga.

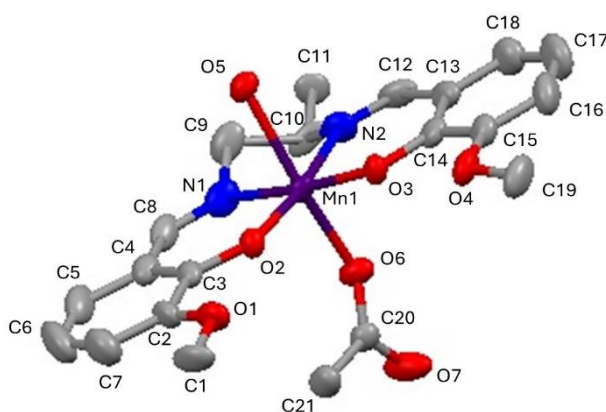


Figura 4.7. Estrutura molecular do complexo $[MnL(CH_3COO)(H_2O)]$.

| Distancias de enlace (Å) | | | |
|--------------------------|----------|------------|----------|
| O(2)-Mn(1) | 1,891(2) | O(3)-Mn(1) | 1,888(3) |
| N(1)-Mn(1) | 1,975(3) | N(2)-Mn(1) | 1,986(3) |
| O(5)-Mn(1) | 2,331(3) | O(6)-Mn(1) | 2,271(3) |
| C(8)-N(1) | 1,273(4) | C(10)-N(2) | 1,285(4) |
| C(9)-N(1) | 1,541(9) | C(12)-N(2) | 1,485(9) |
| C(20)-O(6) | 1,249(5) | C(20)-O(7) | 1,251(4) |
| C(1)-O(1) | 1,445(4) | C(15)-O(4) | 1,371(5) |
| C(2)-O(1) | 1,371(4) | C(19)-O(4) | 1,451(4) |

Táboa 4.3. Distancias de enlace máis importantes do complexo $[MnL(CH_3COO)(H_2O)]$.

| Ángulos de enlace (°) | | | |
|-----------------------|------------|-----------------|------------|
| O(2)-Mn(1)-O(3) | 93,10(9) | O(2)-Mn(1)-N(1) | 92,99(12) |
| O(3)-Mn(1)-N(1) | 173,48(12) | O(2)-Mn(1)-N(2) | 174,62(11) |
| O(3)-Mn(1)-N(2) | 91,12(12) | N(1)-Mn(1)-N(2) | 82,88(14) |
| O(2)-Mn(1)-O(6) | 93,46(11) | O(3)-Mn(1)-O(6) | 98,62(12) |
| N(1)-Mn(1)-O(6) | 85,55(11) | N(2)-Mn(1)-O(6) | 89,63(11) |
| O(2)-Mn(1)-O(5) | 90,62(11) | O(3)-Mn(1)-O(5) | 91,18(12) |
| N(1)-Mn(1)-O(5) | 84,38(11) | N(2)-Mn(1)-O(5) | 85,56(11) |
| O(6)-Mn(1)-O(5) | 169,80(10) | O(6)-C(22)-O(7) | 124,5(7) |

Táboa 4.4. *Ángulos de enlace (°) máis importantes do complexo [MnL(CH₃COO)(H₂O)].*

As táboas 4.3 e 4.4 recollen as distancias e ángulos de enlace desta estrutura, respectivamente. As distancias de enlace Mn-O_{fenólicos}, Mn(1)-O(2) e Mn(1)-O(3) (1,888 e 1,891 Å) diferéncianse só en 0,003 Å, mentres que as distancias Mn-N_{imínico} difiren lixeiramente; Mn(1)-N(1) e Mn(1)-N(2) (1,975 e 1,986 Å respectivamente), sendo todas elas da mesma orde dos complexos de Mn xa estudados polo Grupo de Investigación [39, 45-47], que presentan unha xeometría octaédrica distorsionada.

Nas posicións axiais, as distancias Mn(1)-O(5) e Mn(1)-O(6) (2,331 e 2,271 Å) son maiores que as correspondentes ao plano ecuatorial debido ó efecto Jahn-Teller da configuración d^4 de alto espín que presenta o Mn(III), e tamén debido ao menor poder dador dos osíxenos das moléculas de auga e acetato.

As distancias N-C_{imínico}; C(8)-N(1) e C(12)-N(2) de 1,273 e 1,285 Å respectivamente, son máis curtas cas dos enlaces N-C_{amínico}; C(9)-N(1) e C(10)-N(2) de 1,541 e 1,485 Å, o que evidencia o dobre enlace imínico (C=N). O grupo acetato aparece como a configuración sin anti.

Na figura 4.8 pódese observar como o complexo se presenta en forma de dímero con pontes μ -acu, que se forman por enlaces de hidróxeno a través das moléculas de auga coordinadas nas posicións axiais.

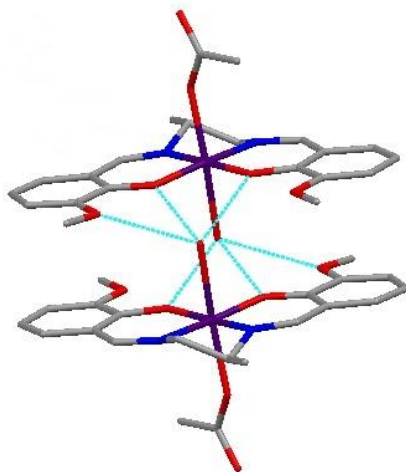


Figura 4.8. Representación do dímero μ -acu.

Como se mencionou anteriormente, entre as moléculas hai enlaces de hidróxeno μ -acu que orixinan o dímero; o H(5A) do O(5) da molécula de auga coordinada en posición axial, enlázase ó O(4) etoxi e ó O(3) fenoxi da molécula veciña. O H(5B) do O(5) da molécula de auga coordinada, enlázase ó O(2) fenoxi e ó O(1) metoxi da molécula veciña.

4.1.2.6. Estudo da voltametría cíclica.

| Velocidade de varrido ($V \cdot s^{-1}$) | Potencial de oxidación, E_{ox} (V) | Potencial de redución, E_{red} (V) | $E_{1/2}$ (V) | ΔE [$E_{ox}-E_{red}$] (mV) |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------|--------------------------------------|
| 0,100 | -0,1222 | -0,2809 | -0.202 | 159 |
| 0,080 | -0,1271 | -0,2735 | -0.201 | 147 |
| 0,050 | -0,1369 | -0,2638 | -0.200 | 127 |
| 0,020 | -0,1418 | -0,2442 | -0.193 | 102 |
| 0,010 | -0,1467 | -0,2394 | -0.193 | 92 |
| 0,005 | -0,1491 | -0,2272 | -0.188 | 78 |

Táboa 4.5. Datos de voltametría cíclica obtidos para $[MnL(CH_3COO)(H_2O)]$.

As propiedades redox do complexo metálico obtido foron estudadas pola técnica de voltametría cíclica. A táboa 4.5 recolle os potenciais de oxidación e redución obtidos por esta técnica a diferentes velocidades de varrido, así como os valores de $E_{1/2}$ e a diferenza entre picos redox.

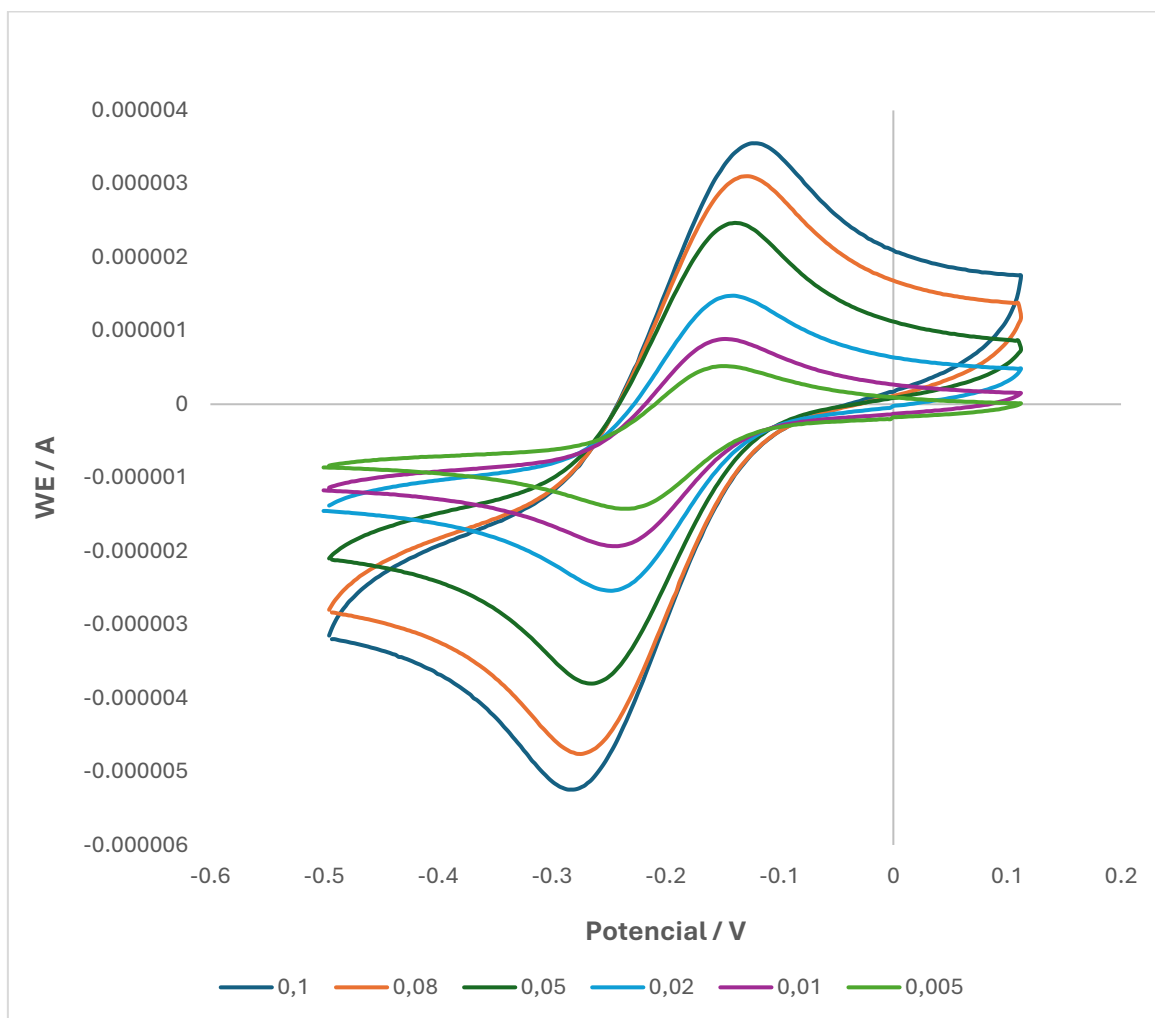


Figura 4.9. Voltamogramas cíclicos obtidos para $[MnL(CH_3COO)(H_2O)]$ a diferentes velocidades de varrido $0,005-0,1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

Os datos obtidos pola voltametría cíclica, representados na Figura 4.9, amosan un alto grao de reversibilidade da onda electroquímica, o cal é fundamental para un comportamento óptimo como catalizador do complexo para as diferentes catálises redox que se pretenden ensaiar. Os estudos electroquímicos mostran un proceso redox Mn(III)/Mn(II) cuase-reversible a -193 mV , cunha separación entre os picos de oxidación e redución de 102 mV á velocidade de varrido de $0.02 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. Os

resultados a diferentes velocidades de varrido indican como o carácter reversible diminúe conforme aumenta a velocidade de varrido [48]. O carácter doador de carga dos substituíntes metoxi nos aneis aromáticos da base de Schiff facilita os valores negativos nos potenciais redox, os cales permitirán alcanzar estados de oxidación máis elevados do manganeso durante a catálise [48].

A Figura 4.10 amosa a dependencia lineal das correntes anódicas e catódicas fronte á raíz cadrada da velocidade de varrido, indicando que é un proceso electroquímico controlado por difusión [49].

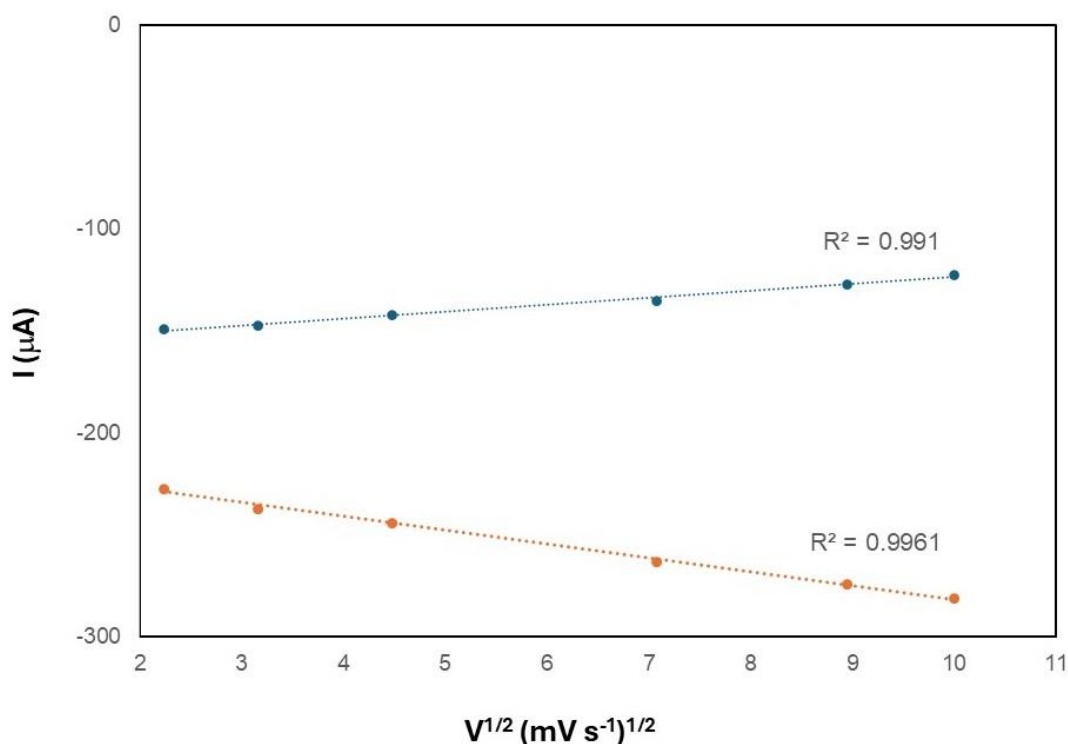


Figura 4.10. Gráfico da dependencia lineal das correntes anódicas e catódicas respecto da raíz cadrada da velocidade de varrido para $[\text{MnL}(\text{CH}_3\text{COO})(\text{H}_2\text{O})]$.

4.2. Estudo da actividade biomimética do complexo metálico.

4.2.1. Estudo da actividade catalítica como mimético do peroxidase.

O ABTS é incoloro pero reacciona con H_2O_2 en presenza do catalizador mimético do peroxidase para dar lugar a un radical catiónico ABTS^+ [50], que presenta bandas de absorción características no UV-Vis a 415, 650, 735 e 815 nm. A extensión da

reacción pode medirse cuantitativamente a $\lambda = 650 \text{ nm}$ xa que foi previamente determinado $\epsilon = 12000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [38]. En ausencia de complexo, unha disolución de ABTS e H_2O_2 é estable varias horas sen presentar a formación de $\text{ABTS}^{\cdot+}$.

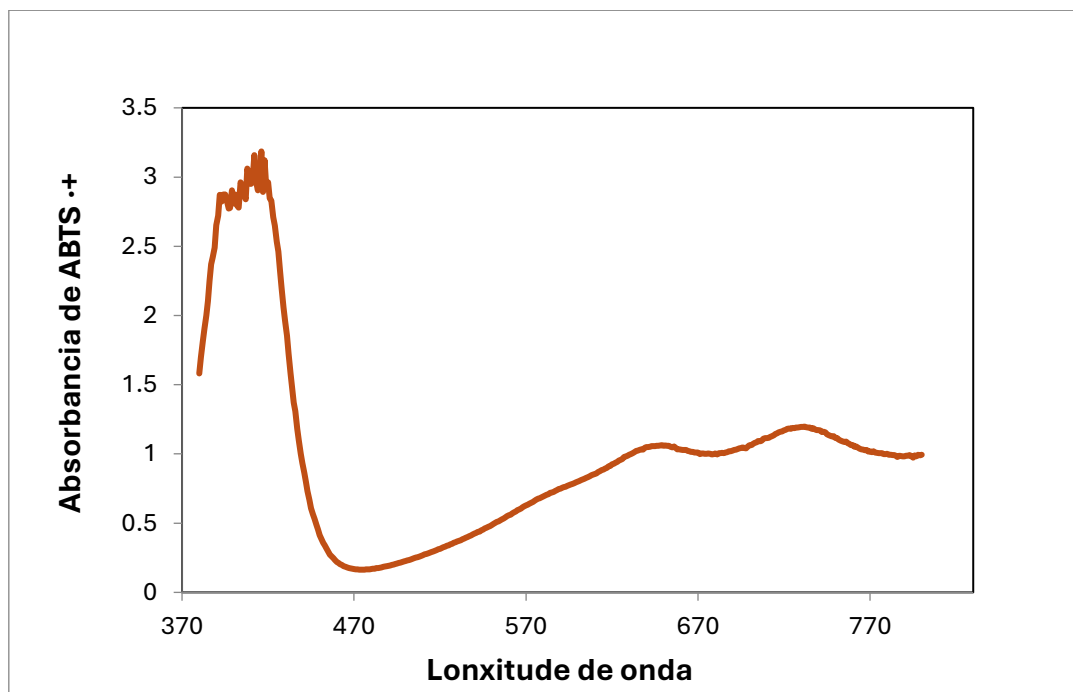


Figura 4.11. Espectro UV-Vis obtido na proba de actividade peroxidase.

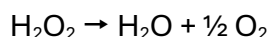
A Figura 4.11 recolle o espectro UV-Vis obtido na proba de actividade peroxidase aos dous minutos aproximadamente do seu inicio. Realizouse o experimento tanto en disolución metanólica como etanólica do complexo obténdose uns resultados similares e reproducibles (ver Táboa 4.6), con valores de conversión de ABTS en $\text{ABTS}^{\cdot+}$ do rango entre 59-68%, o cal implica un número de ciclos catalíticos entre 29 e 31.

| Disolvente | Absorbancia a 650 nm | Moles convertidos de ABTS | % de conversión | Ciclos catalíticos |
|------------|----------------------|---|-----------------|--------------------|
| Etanol | 1,1460 - 1,2279 | $2,865 \cdot 10^{-7}$ - $3,070 \cdot 10^{-7}$ | 63,66 - 68,22 | 29 - 31 |
| Metanol | 1,0585 - 1,1624 | $2,646 \cdot 10^{-7}$ - $2,906 \cdot 10^{-7}$ | 58,81 - 64,58 | 27 - 29 |

Táboa 4.6. Valores de absorbancia obtidos na proba da actividade peroxidase, indicando a porcentaxe de conversión de ABTS en $\text{ABTS}^{\cdot+}$ e o número de ciclos catalíticos do proceso.

4.2.2. Estudo da actividade catalítica como mimético do catalase.

Para a medición da actividade como mimético do catalase utilízase o procedemento indicado no apartado 3.4.2. A reacción a catalizar polo complexo é a propia da dismutación do peróxido:



Mídese volumetricamente o diosíxeno desprendido no proceso, obténdose 30 mL, o cal supón unha porcentaxe de descomposición do peróxido de hidróxeno de 99,55 %. Tamén se calcula o número de ciclos catalíticos que implica tal descomposición de peróxido de hidróxeno, cun valor de 829,60 ciclos catalíticos. Os resultados obtidos nestes estudos son elevados, superiores a doutros complexos ensaiados no seo do grupo de investigación [38,45,48]

4.2.3. Estudo da actividade catalítica como mimético do catecol oxidase.

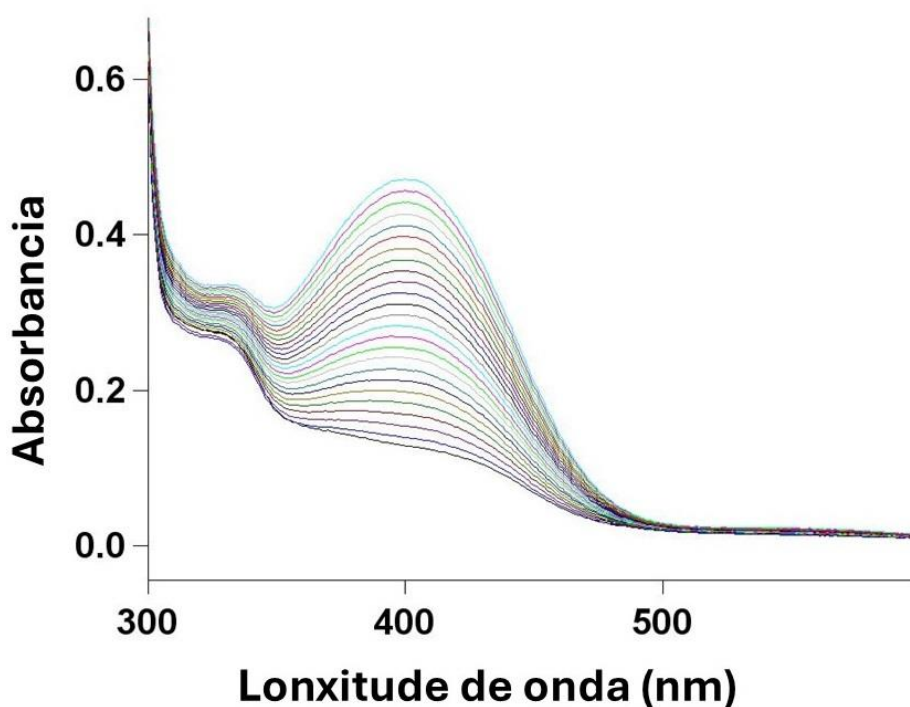


Figura 4.12. Gráfico da variación obtida dos espectros UV-Vis durante o ensaio de actividade catecol oxidase. Os espectros foron medidos en intervalos de cinco minutos durante un período de dúas horas no rango de 300 a 600 nm.

O estudo realizouse seguindo o procedemento descrito no apartado 3.4.3 para facer o seguimento da variación do espectro UV-Vis (Figura 4.12) durante a conversión de 3,5-DTBC en DTBQ, catalizada polo complexo. O proceso de oxidación para a formación da o-quinona pódese seguir cuantitativamente polo aumento de absorbancia a 401 nm do produto formado. Isto tamén se puido observar na coloración da cubeta, que pasou de transparente a amarelo intenso. O coeficiente de extinción molar (ϵ) en metanol da DTBQ é $1900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e utilízase para o cálculo cuantitativo do proceso, de acordo coa bibliografía [37,51-52].

Realizouse o estudo cinético deste proceso utilizando un exceso de 3,5-DTBC con respecto ao complexo de 100, 200, 500 e 1000 equivalentes. Os resultados de conversión e ciclos catalíticos da actividade catecol oxidase recóllense na Táboa 4.7.

| Equivalentes | Absorbancia a 401 nm | Moles DTBQ | % conversión | Ciclos catalíticos |
|---------------------|-----------------------------|---|---------------------|---------------------------|
| 100 | 0,0834-0,0911 | $1,32 \cdot 10^{-7}$ - $1,44 \cdot 10^{-7}$ | 6,59 – 7,19 | 7 |
| 200 | 0,1092-0,1227 | $1,72 \cdot 10^{-7}$ - $1,94 \cdot 10^{-7}$ | 4,31 – 4,84 | 9 - 10 |
| 500 | 0,1581-0,1696 | $2,5 \cdot 10^{-7}$ - $2,68 \cdot 10^{-7}$ | 2,50 – 2,68 | 13 - 14 |
| 1000 | 0,2220-0,2683 | $3,50 \cdot 10^{-7}$ - $4,24 \cdot 10^{-7}$ | 1,75 – 2,12 | 18 - 22 |

Táboa 4.7. Valores de absorbancia, % conversión e ciclos catalíticos dos ensaios catecol oxidase en función do número de equivalentes en exceso de 3,5-DTBC.

Para obter a k_{obs} , aplícase un axuste lineal á representación da concentración de 3,5-DTBQ fronte ao tempo, onde a k_{obs} se corresponde co valor da pendente na ecuación $y = ax + b$. Calcúlase para as diferentes concentracións do complexo de manganeso (Figura 4.13).

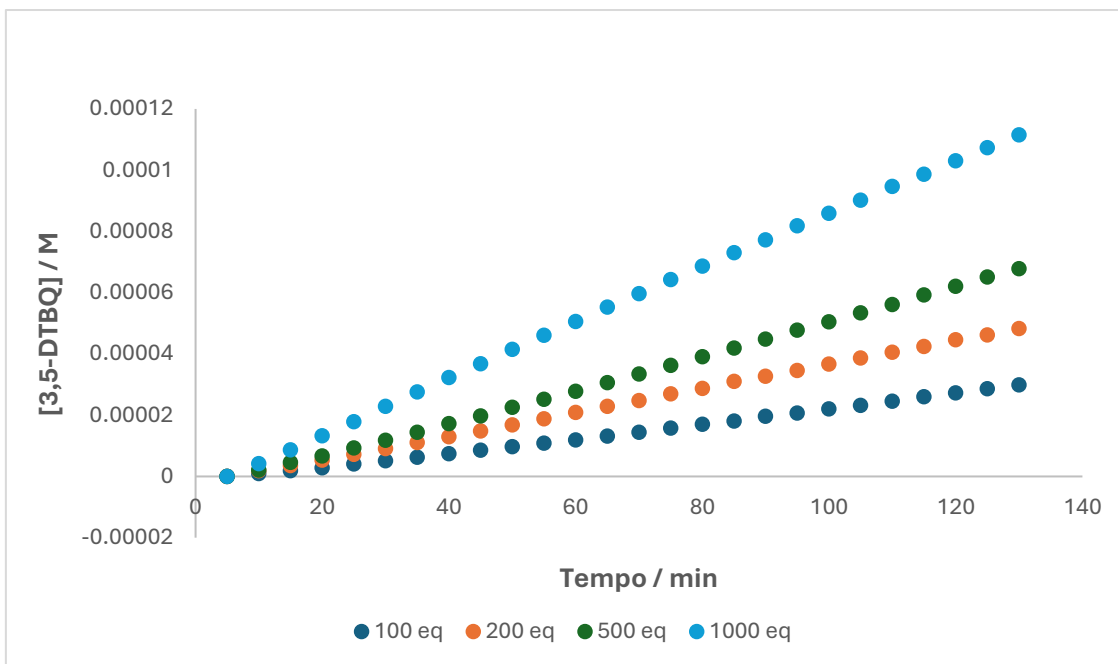


Figura 4.13. *Relación da formación do substrato catalizada polo complexo fronte ao tempo.*

Na figura 4.14 representáanse os valores da k_{obs} fronte á concentración inicial do substrato (3,5- DTBC). Se se aplica un axuste logarítmico á curva obtida pódese determinar o valor da $K_M = 2 \cdot 10^{-7}$, que se corresponde coa pendente da ecuación $y = a \cdot \ln(x) + b$, cando se aplica un axuste logarítmico á curva obtida.

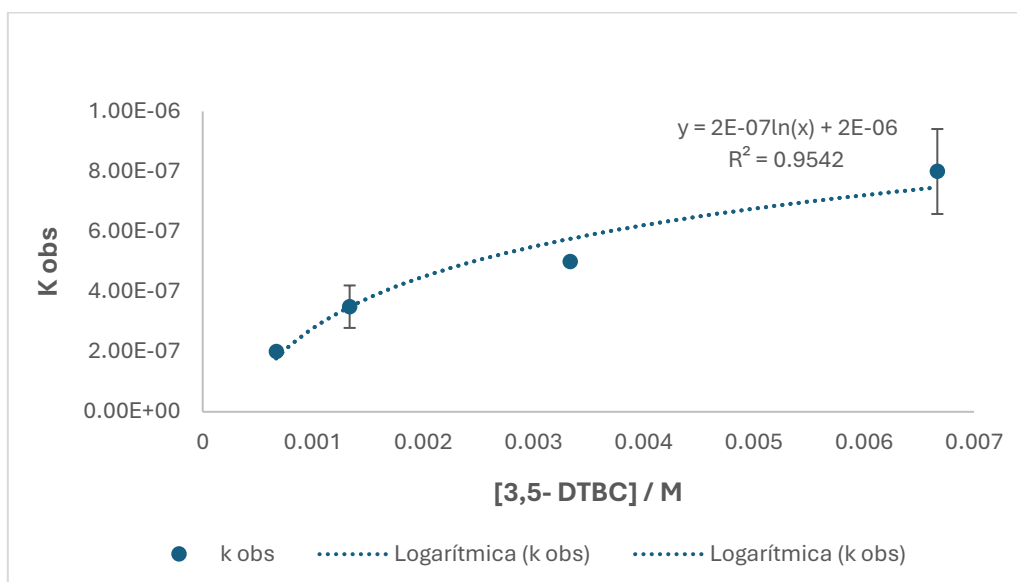


Figura 4.14. *Representación dos valores de K_{obs} fronte á concentración de substrato inicial e axuste logarítmico da curva para o ensaio catecol oxidase.*

5. Conclusións

Pódese concluír que:

- A síntese do ligando H₂L foi correcta, presentando un elevado rendemento e pureza.
- A síntese do complexo de manganeso (III) a partir do ligando e acetato de manganeso (II) tetrahidratado foi adecuada, mostrando unha alta pureza e rendemento.
- As técnicas de caracterización confirman que os compostos obtidos son os desexados.
- O ensaio da condutividade mostra que o complexo non presenta natureza de electrolito.
- Os estudos espectroscópicos indican que o ligando coordina a través do nitróxeno imínico e a través do osíxeno fenólico co metal, funcionando como un ligando tetradentado.
- Obtéñense cristais do complexo que confirman a súa xeometría octaédrica distorsionada cun índice de coordinación seis.
- Obsérvase unha elevada reversibilidade do proceso redox Mn(III)/Mn(II), especialmente a velocidades de varrido baixas.
- O complexo presenta actividade catalítica como os diferentes encimas estudados: peroxidase, catalase e catecol oxidase. Destaca a catalase debido ao maior número de ciclos catalíticos e porcentaxe de conversión do substrato que presenta, case do 100%.
- Confírmase o seu papel como catalizador biomimético de procesos redox como nos que participan os encimas que tamén mimetiza.

6. Referencias

- [1] He, L.; He, T.; Farrar, S.; Ji, L.B.; Liu, T.Y.; Ma, X. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cell Physiol. Biochem.* **2017**, *44*, 532–553; DOI: 10.1159/000485089.
- [2] Villamena, F.A. Chemistry of Reactive Species. *Mol. Basis Oxidative* **2013**, 1–48; DOI: 10.1002/9781118355886.ch1.
- [3] Rouco, L.; González-Noya, A.M.; Pedrido, R.; Maneiro, M. Pursuing the Elixir of Life: In Vivo Antioxidative Effects of Manganosalen Complexes. *Antioxidants* **2020**, *9*, 727. <https://doi.org/10.3390/antiox9080727>.
- [4] Propac, P.; Jomova, K.; Simunkova, M.; Kollar, V.; Rhodes, C.J.; Valko, M. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, *38*, 592–607; DOI: 10.1016/j.tips.2017.04.005.
- [5] Rouco, L.; Alvariño, R.; Alfonso, A.; Fernández-Fariña, S.; González-Noya, A.M.; Martínez-Calvo, M.; Pedrido, R.; Rodríguez-Silva, L.; Maneiro, M. Understanding the Factors That Influence the Antioxidant Activity of Manganosalen Complexes with Neuroprotective Effects. *Antioxidants* **2024**, *13*, 265; DOI: 10.3390/antiox13030265.
- [6] Kurutas, E.B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: Current state. *Nutr. J.* **2016**, *15*, 71; DOI: 10.1186/s12937-016-0186-5.
- [7] Signorella, S.; Palopoli, C.; Ledesma, G. Rationally designed mimics of antioxidant manganoenzymes: Role of structural features in the quest for catalysts with catalase and superoxide dismutase activity. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *305*, 75–102; DOI: 10.1016/j.ccr.2018.03.005.
- [8] Erxleben, A. Transition metal salen complexes in bioinorganic and medicinal chemistry. *Inorg. Chim. Acta* **2018**, *472*, 40–57; DOI: 10.1016/j.ica.2017.06.060.
- [9] Cotton, F. A.; Wilkinson, R. G. *Química Inorgánica Avanzada*, 4ª Ed., Ed. Limusa, México, 889 (1986). ISBN 13:9789681808839.

- [10] Pirson, A. Z. Ernährungs- und stoffwechselfysiologische Untersuchungen an Fontinalis und Chlorella. *Z. Bot.* **1937**, *31*, 193-267.
- [11] Zhu, W.; Richards, N.G.J. Biological functions controlled by manganese redox changes in mononuclear Mn-dependent enzymes. *Essays Biochem.* **2017**, *61*, 259–270; DOI: 10.1042/EBC20160070.
- [12] Pessoa, J.C.; Correia, I. Salan vs. salen metal complexes in catalysis and medicinal applications: Virtues and pitfalls. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *388*, 227–247; DOI: 10.1016/j.ccr.2019.02.035.
- [13] Policar, C.; Bouvet, J.; Bertrand, H.C.; Delsuc, N. SOD mimics: From the tool box of the chemists to cellular studies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2022**, *67*, 102109; DOI: 10.1016/j.cbpa.2021.102109.
- [14] Palopoli, C.; Ferreyra, J.; Conte-Daban, A.; Richezzi, M.; Foi, A.; Doctorovich, F.; Anxolabéhère-Mallart, E.; Hureau, C.; Signorella, S.R. Insights into second-sphere effects on redox potentials, spectroscopic properties, and superoxide dismutase activity of manganese complexes with Schiff-base ligands. *ACS Omega* **2019**, *4*, 48–57; DOI: 10.1021/acsomega.8b03018.
- [15] Iranzo, O. Manganese complexes displaying superoxide dismutase activity: A balance between different factors. *Bioorg. Chem.* **2011**, *39*, 73–87; DOI: 10.1016/j.bioorg.2011.02.001.
- [16] Raber, J.; Davis, M.J.; Pfankuch, T.; Rosenthal, R.; Doctrow, S.R.; Moulder, J.E. Mitigating effect of EUK-207 on radiation-induced cognitive impairments. *Behav. Brain Res.* **2017**, *320*, 457–463; DOI: 10.1016/j.bbr.2016.10.038.
- [17] Browne, S.E.; Roberts II, L.J.; Dennerly, P.A.; Doctrow, S.R.; Beal, M.F.; Barlow, C.; Levine, R.L. Treatment with a catalytic antioxidant corrects the neurobehavioral defect in ataxia-telangiectasia mice. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *36*, 938–942; DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.003.
- [18] Brazier, M.W.; Doctrow, S.R.; Masters, C.L.; Collins, S.J. A manganese-superoxide dismutase/catalase mimetic extends survival in a mouse model of human prion

- disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45*, 184–192; DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.006.
- [19] Hinerfeld, D.; Traini, M.D.; Weinberger, R.P.; Cochran, B.; Doctrow, S.R.; Harry, J.; Melov, S. Endogenous mitochondrial oxidative stress: Neurodegeneration, proteomic analysis, specific respiratory chain defects, and efficacious antioxidant therapy in superoxide dismutase 2 null mice. *J. Neurochem.* **2004**, *88*, 657–666; DOI: 10.1046/j.1471-4159.2003.02195.x.
- [20] Bilal, M.; Zdarta, J.; Jesinowski, T.; Iqbal, H. M. N. Manganese peroxidases as robust biocatalytic tool — An overview of sources, immobilization, and biotechnological applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *234*, 123531; DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123531.
- [21] Zámocký, M.; Furtmüller, P. G.; Obinger, C. Evolution of structure and function of peroxidases. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *500*, 45–57; DOI: 10.1016/j.abb.2010.03.024.
- [22] Brigelius-Flohé, R.; Maiorino, M. Glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 3289–3303; DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
- [23] Barynin, V.V.; Whittaker, M.M.; Antonyuk, S.V.; Lamzin, V.S.; Harrison, P.M.; Artymiuk, P.J.; Whittaker, J.W. Crystal structure of manganese catalase from *Lactobacillus Plantarum*. *Structure* **2001**, *9*, 725–738; DOI: 10.1016/S0969-2126(01)00628-1.
- [24] Whittaker, J. W. Non-heme manganese catalase—the ‘other’ catalase. *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *525*, 111–120; DOI: 10.1016/j.abb.2011.12.008.
- [25] Ballal, A.; Chakravarty, D.; Bihani, S. C.; Banerjee, M. Gazing into the remarkable world of non-heme catalases through the window of the cyanobacterial Mn-catalase ‘KatB’. *Free Rad. Biol. Med.* **2020**, *160*, 480–487; DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.08.013.
- [26] Ito, S.; Sugumaran, M.; Wakamatsu, K. Chemical Reactivities of *ortho*-Quinones Produced in Living Organisms: Fate of Quinonoid Products Formed by Tyrosinase

- and Phenoloxidase Action on Phenols and Catechols. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6080; DOI: 10.3390/ijms21176080.
- [27] Deverall, B. J. Phenolase and Pectic Enzyme Activity in the Chocolate Spot Disease of Beans. *Nature* **1961**, *189*, 311; DOI: 10.1038/189311a0.
- [28] Rompel, A.; Fischer, H.; Meiwes, D.; Büldt-Karentzopoulos, K.; Dillinger, F.; Witzel, H.; Krebs, B. Purification and spectroscopic studies on catechol oxidases from *Lycopus europaeus* and *Populus nigra*: evidence for a dinuclear copper center of type 3 and spectroscopic similarities to tyrosinase and hemocyanin. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 56, DOI: 10.1007/s007750050289.
- [29] Koval, I. A.; Gamez, P.; Belle, C.; Selmeczi, K.; Reedijk, J. Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mechanistic studies. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 814-840; DOI: 10.1039/B516250P.
- [30] Boutaybi, M.E.; Titi, A.; Alzahrani, A.Y.A.; Bahari, Z.; Tillard, M.; Hammouti, B.; Touzani, R. Aerial Oxidation of Phenol/Catechol in the Presence of Catalytic Amounts of [(Cl)₂Mn(RCOOET)], RCOOET= Ethyl-5-Methyl-1-(((6-Methyl-3-Nitropyridin-2-yl)Amino)Methyl)-1*H*-Pyrazole-3-Carboxylate. *Catalysts* **2022**, *12*, 1642. <https://doi.org/10.3390/catal12121642>.
- [31] SAINT, N. T. version 6.45; Bruker Analytical X-ray Systems. *Inc.: Madison, WI*, 2003.
- [32] SADABS, Sheldrick GM. Program for scaling and correction of area detector data. *Göttingen: University of Göttingen*, 1996.
- [33] Altomare, A., Burla, M.C., Camalli, M., Cascarano, G. L.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Moliterni, A. G. G.; Polidori, G.; Spagna, R. SIR97: A New Tool for Crystal Structure Determination and Refinement. *J. Appl. Cryst.* **1999**, *32*, 115-119; DOI: 10.1107/S0021889898007717.
- [34] Sheldrick, G. M. A short history of SHELX. *Acta Cryst. Sect. A* **2008**, *64*, 112-122; DOI: 10.1107/S0108767307043930.
- [35] Macrae, C. F.; Bruno, I. J.; Chisholm, J. A.; Edgington, P. R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Rodriguez-Monge, L.; Taylor, R.; van de Streek, J.; Wood, P. A. Mercury CSD 2.0–

- new features for the visualization and investigation of crystal structures. *J. Appl. Cryst.* **2008**, *41*, 466-470; DOI: 10.1107/S0021889807067908.
- [36] Solomon, E. I.; Sundaram, U. M.; Machonkin, T. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2563–2606; DOI: 10.1021/cr950046o.
- [37] Banu, K. S.; Chattopadhyay, T.; Banerjee, A.; Bhattacharya, S.; Suresh, E.; Nethaji, M.; Zangrando, E.; Das, D. *Inorg. Chem.* **2008**, *47* (16), 7083–7093; DOI: 10.1021/ic701332w.
- [38] Maneiro, M.; Bermejo, M.R.; Fernández, M.I.; Gómez-Fórneas, E.; González-Noya, A.M.; Tyryshkin, A.M. A new type of manganese-Schiff base complex, catalysts for the disproportionation of hydrogen peroxide as peroxidase mimics. *New J. Chem.* **2003**, *27*, 727–733; DOI: 10.1039/B210738D.
- [39] Barreiro-Sisto, U.; Fernández-Fariña, S.; Fernández-García, M.I.; González-Noya, A.M.; Velo-Helena, I.; Maneiro, M. Electrochemical Conversion of 5-Hydroxymethylfurfural to 2,5-Furandicarboxaldehyde Using Mn(III)-Schiff Base Catalysts. *Inorganics* **2025**, *13*, 30; DOI: 10.3390/inorganics13020030.
- [40] Vázquez-Fernández, M.A.; Fernández-García, M.I.; González-Riopedre, G.; Maneiro, M.; Rodríguez-Doutón, M.J. Self-assembled biomimetic catalysts: Studies of the catalase and peroxidase activities of Mn(III)-Schiff base complexes. *J. Coord. Chem.* **2011**, *64*, 3843–3858; DOI: 10.1080/00958972.2011.633164.
- [41] Geary, W.J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. *Coord. Chem. Rev.* **1971**, *7*, 81–122; DOI: 10.1016/S0010-8545(00)80009-0.
- [42] Rigamonti, L.; Zardi, P.; Carlino, S.; Demartin, F.; Castellano, C.; Pigani, L.; Ponti, A.; Ferretti, A.M.; Pasini, A. Selective Formation, Reactivity, Redox and Magnetic Properties of Mn^{III} and Fe^{III} Dinuclear Complexes with Shortened Salen-Type Schiff Base Ligands. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7882, DOI:10.3390/ijms21217882.
- [43] Oyaizu, K; Nakagawa, T.; Tsuchida, E. Crystal structures of dimeric manganese(III) complexes of tetradentate Schiff-base ligands with ancillary axial donors. *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *305*, 184-188; DOI: 10.1016/S0020-1693(00)00135-3.

- [44] M. Collomb, C. Mantel, S. Romain, C. Duboc, J. Lepetre, J. Pecaut, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 3179-3187; DOI: 10.1002/ejic.201402032.
- [45] Vázquez-Fernández, M.Á.; Bermejo, M.R.; Fernández-García, M.I.; González-Riopedre, G.; Rodríguez-Doutón, M.J.; Maneiro, M. Influence of the geometry around the manganese ion on the peroxidase and catalase activities of Mn (III)–Schiff base complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 1538–1547; DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2011.09.002.
- [46] Vázquez-Fernández, M.Á.; Fernández-García, M.I.; González-Noya, A.M.; Maneiro, M.; Bermejo, M.R.; Rodríguez-Doutón, M.J. Supramolecular networks of Mn (III)–Schiff base complexes assembled by nitrate counterions: X-ray crystal structures of 1D chains and 2D networks. *Polyhedron* **2012**, *31*, 379–385; DOI: 10.1016/j.poly.2011.09.031.
- [47] Liberato, A.; Fernández-Trujillo, M.J.; Máñez, A.; Maneiro, M.; Rodríguez-Silva, L.; Basallote, M.G. Pitfalls in the ABTS Peroxidase Activity Test: Interference of Photochemical. *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 14471–14475; DOI: 10.1021/acs.inorgchem.8b02525.
- [48] Rouco, L.; Liberato, A.; Fernández-Trujillo, M.J.; Máñez, A.; Basallote, M.G.; Alvariño, R.; Alfonso, A.; Botana, L.M.; Maneiro, M. Salen-manganese complexes for controlling ROS damage: Neuroprotective effects, antioxidant activity and kinetic studies. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, *203*, 110918; DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110918.
- [49] N. Elgrishi, K.J. Rountree, B.D. McCarthy, E.S. Rountree, T.T. Eisenhart, J.L. Dempsey, A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry, *J. Chem. Educ.* **2018**, *95*, 197–206; DOI: 10.1021/acs.jchemed.7b00361.
- [50] Eulerling, B.; Schmidt, M.; Pinkernell, V.; Karst, U.; Krebs, B. An unsymmetrical dinuclear iron(III) complex with peroxidase properties. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 1973–1974; DOI: 10.1002/anie.199619731.
- [51] Singha Mahapatra, T.; Basak, D.; Chand, S.; Lengyel, J.; Shatruck, M.; Bertolasi, V.; Ray, D. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 13576–13589; DOI: 10.1039/C6DT02494G.

[52] Mukherjee, D.; Nag, P.; Shteinman, A. A.; Vennapusa, S. R.; Mandal, U.; Mitra, M.
RSC Adv. **2021**, *11*, 22951–22959; DOI: 10.1039/d1ra02787e.