

---

## SIMCats: una alternativa de biomiméticos para reacciones símil peroxidasas

Gaddi Gisela M. \*, Parente Juliana E., Williams Patricia.A.M., Ferrer Evelina G.

CEQUINOR, CONICET-UNLP-Asoc. CICPBA, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Bv. 120 No 1465, 1900 La Plata, Argentina. email: giselagaddi@quimica.unlp.edu.ar

**Palabras Claves:** SIMCats, biocatálisis, actividad símil peroxidasa

---

### Resumen

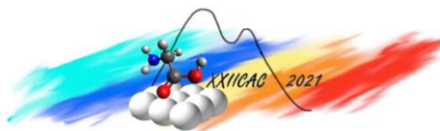
**Introducción:** El uso de enzimas naturales o artificiales en el campo medicinal y/o industrial presenta limitaciones (costos, sensibilidad a la manipulación, etc). Frente a estas dificultades, y tanto para ser utilizados como suplemento farmacológico o para actuar sobre sustratos específicos a nivel industrial, se encuentra en desarrollo una nueva línea de compuestos denominadas SIMCats (catalizadores metálicos intracelulares de moléculas pequeñas). En este trabajo se presenta la actividad símil peroxidasa de un potencial SIMCat: un complejo de coordinación dimérico sintetizado a partir del ligando propiltiouracilo y catión  $\text{Cu}^{2+}$ :  $[\text{Cu}_2(\text{ptu-S-ptu})_2]$ . **Experimental:** para la determinación de las actividades símil peroxidasas mediante espectroscopia UV-Vis se utilizaron las técnicas de bromación de rojo fenol (pH=5,8) y de oxidación catalítica de pirogalol (pH=7) como sustratos orgánicos.

**Resultados y conclusiones:** Las determinaciones catalíticas (Michaelis-Menten) basadas en los modelos de actividad de las peroxidasas indican que utilizando rojo fenol como sustrato el complejo es capaz de simular la acción de las bromoperoxidasas ( $K_m = 5.98 \times 10^{-5} \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}}/K_m = 2.56 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) así como también oxidar al pirogalol aunque menos eficientemente ( $K_m = 2.38 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}}/K_m = 73.95 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ).

---

### Abstract

**Introduction:** The use of natural or artificial enzymes in the medicinal and/or industrial field presents limitations (costs, sensitivity to handling, etc.). To avoid these difficulties and to be used as a pharmacological supplement or to act on specific substrates at an industrial level, a new line of compounds called SIMCats (intracellular metal catalysts of small molecules) is under development. This paper presents the activity símil peroxidase of a potential SIMCat: a binuclear complex synthesized with the propylthiouracil ligand and cation  $\text{Cu}^{2+}$ :  $[\text{Cu}_2(\text{ptu-S-ptu})_2]$ . **Experimental:** for the determination of peroxidase-like activities by UV-Vis spectroscopy, the techniques of bromination of red phenol (pH = 5.8) and catalytic oxidation of pyrogallol (pH = 7) were used. **Results and conclusions:** The catalytic determinations (Michaelis-Menten) based on the peroxidase activity models indicate that using phenol red as a substrate the complex is able to simulate the action of bromoperoxidase ( $K_m = 5.98 \times 10^{-5} \mu\text{M}$ ),  $k_{\text{cat}}/K_m = 2.56 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  as well as oxidize pyrogallol although in a less efficient manner ( $K_m = 2.38 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}}/K_m = 73.95 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ).



## Introducción

La catálisis es un área importante de la química que puede resolver problemas futuros relacionados con nuevos materiales para la industria, la medicina y los recursos energéticos. Los investigadores han centrado la atención en la biocatálisis, la organocatálisis o el uso de complejos metálicos metabolizables [1]. Debido a las restricciones en el uso de metaloenzimas naturales o artificiales, los llamados SIMCats (catalizadores metálicos intracelulares de moléculas pequeñas) se convirtieron en un tema relevante para la integración de catalizadores inorgánicos con sistemas vivos [2]. En ese contexto muchos investigadores vienen trabajando en los denominados MEM (sistemas imitadores de enzimas que contienen metales) ya que han logrado simular varias enzimas naturales como la esterasa, la ribonucleasa, la hidrolasa, la oxidoreductasa, la superóxido dismutasa, las peroxidasa, etc.[3] Dentro de ese panorama internacional, nuestro grupo de investigación viene realizando una serie de compuestos que se esperan puedan funcionar como simuladores de enzimas poniendo especial interés en las peroxidasa.[4] En relación con esa temática, se presentan en este trabajo los estudios “*in vitro*” realizados para determinación de actividad símil-peroxidasa del complejo binuclear  $[\text{Cu}_2(\text{ptu-S-ptu})_2]$  (ptu=propiltiouracilo).

## Experimental

Para la determinación “*in vitro*” de las actividades símil-peroxidasa se utilizaron métodos espectrofotométricos (UV-Vis, equipo: Shimadzu 2600/2700).

**Reacción de la bromoperoxidasa** El experimento realizado para la actividad de bromación se realizó a  $25 \pm 0,5$  °C, pH 5,8. La reacción se inicia con la presencia de diferentes concentraciones de solución de rojo fenol (5-7,5-10-15-17,5  $\mu\text{M}$ ), una alícuota de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30%, 2M KBr y 2,8 mg de complejo. Se detecta la formación del producto azul de bromofenol ( $\epsilon=14,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

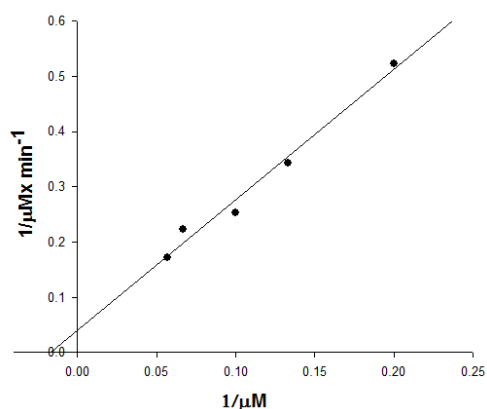
**Oxidación catalítica del pirogalol.** La capacidad de oxidación de pirogalol se determinó mediante el monitoreo del aumento de absorbancia a 420 nm (formación de purpurogalina,  $\epsilon = 2640 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) durante un máximo de 25 min. La reacción se llevó a cabo a pH 7). La cinética de la reacción se determinó variando la concentración de pirogalol (0,0355-0,2 mM) manteniendo una concentración fija de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,025 mM y catalizador, 1,2 mg) a una temperatura a 37°C.

## Resultados y discusión

En la Tabla (ver abajo) que se muestra a continuación se pueden observar los resultados obtenidos para las determinaciones de las actividades símil-peroxidasa.

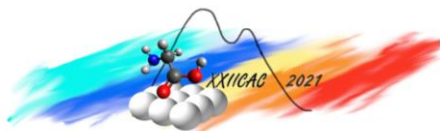
En ambos experimentos la reacción presenta una cinética de saturación y sigue el comportamiento de Michaelis-Menten con respecto al catalizador utilizado. Como ejemplo mostramos en la Figura la gráfica obtenida para la cinética del rojo fenol

Para rojo fenol, el bajo valor de  $K_m$  junto con la mayor eficiencia catalítica sugiere una fuerte afinidad de sustrato. El porcentaje de conversión es mayor a una concentración más baja de rojo fenol.



**Figura.** Representación de Lineweaver-Burk (rojo fenol).

A 120 segundos del tiempo de reacción, el catalizador provocó un 91% (5 $\mu\text{M}$ ) y un 85,3% (7,5  $\mu\text{M}$ ) de conversión. Se observan porcentajes similares a 10  $\mu\text{M}$  y 15  $\mu\text{M}$  (64,8% y 62,4%, respectivamente) mientras que el más bajo es de 53,8% para la concentración de sustrato de 17,5  $\mu\text{M}$ . La selectividad aumenta con el tiempo, alcanzando un máximo a los 120 segundos y siendo también máxima para la concentración mínima de rojo fenol utilizada.


**Tabla.** Actividad símil-peroxidasa del complejo  $[\text{Cu}_2(\text{ptu-S-ptu})_2]$ .

<b>Bromoperoxidasas-Rojo fenol</b>			
$V_{\max}$ ( $\text{Mxmin}^{-1}$ )	$K_m$ (M)	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
$2.53 \times 10^{-5}$	$5.98 \times 10^{-5}$	1.53	$2.56 \times 10^4$
<b>Rojo fenol (<math>\mu\text{M}</math>)</b>		<b>TON<sup>a</sup></b>	
5.0		0.75	
7.5		1.04	
10.0		1.33	
15.0		1.43	
17.5		1.77	
<b>Pirogalol</b>			
$V_{\max}$ ( $\text{Mxmin}^{-1}$ )	$K_m$ (M)	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
$4.39 \times 10^{-7}$	$2.38 \times 10^{-4}$	$1.76 \times 10^{-2}$	73.95
<b>Pirogalol (<math>\mu\text{M}</math>)</b>		<b>TON<sup>b</sup></b>	
35.5		1.07	
50		1.61	
80		2.00	
122		3.50	
200		4.45	

TON<sup>a</sup>= calculados a los 5 min del tiempo de la reacción. TON<sup>b</sup> calculados a 600 seg del tiempo de la reacción.

La cinética de pirogalol se muestra menos eficiente. Para las cinco cantidades del sustrato utilizado (35,5, 50, 80, 122 y 200  $\mu\text{M}$ ) el % de conversión a los 600 segundos del tiempo de reacción conduce a resultados casi idénticos para 35,5  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$  y sorprendentemente a 122  $\mu\text{M}$  pero con un máximo aproximado de ~20% de conversión.

### Conclusiones

Los datos muestran (Tabla) que el valor de  $K_m$  para el pirogalol es mayor que el valor de  $K_m$  para el rojo fenol, y que la eficiencia catalítica ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) es  $\sim 10^3$  veces menor. Por lo tanto, el complejo binuclear resultó más efectivo sobre la catálisis del rojo fenol comportándose como un mejor imitador de las bromoperoxidasas.

### Agradecimientos

A los organismos e instituciones que suministran los fondos y/o espacios físicos para la ejecución del presente trabajo: CONICET (PIP1999), UNLP (X777), ANPCyT (PICT 2016-1814), CICPBA y CEQUINOR.

### Referencias

- [1] A.H Ngo, S. Bose, L.H. Chem. Eur J. 24 (2018) 1-12.
- [2] J.J. Soldevila-Barreda, N. Metzler-Nolte, N. Chem. Rev. 119(2019) 829-869.
- [3] B. Du.; D.Li.; J.Wang.; E. Wang, Adv. Drug Deliv. Rev. 118(2017) 78-93.
- [4] J.E. Parente, P.A.M. Williams, E.G.Ferrer, Biol. Trace Elem. Res. 195 (2020) 725-731.