



APLICACIÓN DE LA QUÍMICA COMBINATORIA PARA LA OBTENCIÓN DE QUIMIOTECAS CON ACTIVIDAD CATALÍTICA A PARTIR DE AMINOÁCIDOS CONSERVATIVOS

Anna Ilyina, David Ibarra Coronado, Kalaichelvan Gurumurthy

Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.
Blvd. V. Carranza e Ing. J. Cárdenas V., Col. República, C.P. 25280, Saltillo, Coahuila. Fax: 01 844 4159534.
Correo electrónico: anna_ilyina@hotmail.com

Palabras clave: xenoenzimas, aminoácidos conservativos, micelas inversas, síntesis de polipéptidos

Introducción. El conocimiento acumulado en el área de las estructuras de biocatalizadores estimula el desarrollo de los trabajos enfocados a la obtención de los catalizadores artificiales (xenoenzimas). El concepto de “aminoácidos conservativos” se reveló recientemente como resultado de las investigaciones en el área de bioinformática (1). Se demostró que existen aminoácidos que se caracterizan por un bajo valor (prácticamente nulo) de entropía de Shannon $H = -\sum p(i) \log(p(i))$ que está en función de la probabilidad (p_i) de encontrar un aminoácido en cierta posición de las secuencias. Se ha revelado que existen 10 aminoácidos que con la frecuencia de 90% se encuentran formando parte de los centros activos y que los dos aminoácidos: glicina (37.5%) y ácido aspártico (12.9%) tiene frecuencia de 50%. Los aminoácidos: aspártico, histidina y arginina forman parte de los sitios catalíticos jugando el papel de agentes núcleo- y electrofílicos dentro de la catálisis enzimática. A pesar de que la glicina no tiene los grupos funcionales se responsabiliza de la flexibilidad de la cadena proteica dentro del proceso conocido como correspondencia inducida (1). Además, el análisis de base de datos Swiss-Prot demostró que leucina (aminoácido hidrofóbico) es más frecuente encontrar en diferentes proteínas aun en posiciones distintas a sitios activos (1).

En el presente trabajo, considerando estos resultados de bioinformática, se propuso realizar la obtención de quimiotecas a partir de 5 aminoácidos: 4 conservativos (glicina, ácido aspártico, histidina, arginina) y leucina para la búsqueda de la actividad catalítica.

Metodología. Para la síntesis de enlaces polipeptídicos se usó la reacción de policondensación con 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC). La síntesis se realizó en fase acuosa y en el sistema de micelas inversas AOT (0.05 M)- hexano- fase acuosa (buffer fosfatos a pH 8). El diseño de obtención de quimiotecas se basó en la solubilidad de aminoácidos seleccionados en buffer y en el sistema de micelas inversas. La concentración de DCC se varió: se usaron las proporciones equimolares y en 10 veces menor y mayor a la concentración de aminoácidos. En diferentes ensayos en las quimiotecas obtenidas se evaluó la actividad: laccasa (utilizando ABTS), peroxidasa (con ABTS en presencia de hidroperóxido), hidrolasa (con NIPAB) y fenoloxidasas (con catecol). La evaluación de actividad se realizó sin y con diferentes cofactores (iones de Zn, Cu, Mn y hemina). En los ensayos iniciales, la actividad se apreció por aumento de absorbancia comparándolo con el observado en la mezcla de reacción obtenida en ausencia de

aminoácidos pero bajo mismas condiciones como en la síntesis. Posteriormente, las respuestas positivas se sometieron a los ensayos cinéticos.

Resultados y discusión. En la quimioteca obtenida mediante la síntesis en buffer fosfatos no se detectó ninguna de las actividades. En quimiotecas obtenidas en los sistemas de micelas inversas se detectó la actividad de oxidación de ABTS solo en presencia de iones de Zn como cofactores. En ausencia o presencia de otros cofactores no se observó la diferencia en la cinética de la oxidación de ABTS al compararlo con control sin aminoácidos. Capacidad para acelerar proceso de oxidación de ABTS se observó en todas quimiotecas obtenidas. Sin embargo, éste se aprecia solamente después de nueve días de la síntesis. En la Figura 1 se presentan las cinéticas obtenidas bajo diferentes condiciones de ensayo.

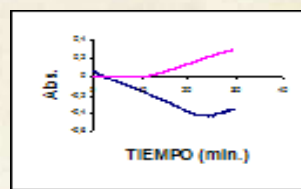


Figura 1. Cinética de oxidación de ABTS en presencia de quimioteca (curva de arriba) y el control obtenido sin aminoácidos (curva de abajo): derecha, - en presencia de iones de Zn; izquierda en presencia de iones de Cu.

Al agregar el reactivo azul de comassie se comprobó la presencia de los polipéptidos que fue posible precipitar con acetona. Las quimiotecas mostraron la precipitación de DCC al ser almacenadas a temperatura ambiente y una disminución en la actividad probablemente relacionada con el proceso de precipitación.

Conclusiones. Los resultados obtenidos demuestran la posibilidad de obtener los catalizadores a partir de aminoácidos conservativos lo que comprueba su importante papel en proceso de catálisis enzimática. Se demostró que los métodos de química combinatoria pueden ser útiles en la búsqueda de nuevos catalizadores sintéticos.

Agradecimiento. Proyecto SEP-CONACYT 42522.

Bibliografía. 1. Varfolomeev S.D., Uporov I.V., Fedorov E.V. 2002. Bioinformatics and molecular modeling in chemical enzymology. Active sites of hydrolases. *Biochemistry (Russia)*. **67 (10)**:1328-1336.

2. Varfolomeev S.D. 2004. Catalytic centres of enzymes: structural paradoxes, the phenomenon of structural unity and new reactions. *Mendeleev Communications*. **14 (5)**: 185-188.