



PUEBAS DE ESPECIFICIDAD DE SUSTRATOS DE UNA ESTERASA DE *Aspergillus nidulans* INVOLUCRADA EN LA BIOSÍNTESIS DE UN PRECURSOR DE AFLATOXINAS.

Carolina Peña Montes, Norma Ballesteros, Amelia Farrés González Saravia y Arturo Navarro Ocaña
Facultad de Química. Depto. Alimentos y Biotecnología. Conjunto "E". Laboratorio 312. 04510, Ciudad Universitaria.
UNAM. México, D.F. Tel: 56 22 53 05. Fax.: 56 22 53 09. E-mail: farres@servidor.unam.mx.

Palabras clave: flavonoides, hidroxicinámicos, núcleos esteroidales, esterasa, *Aspergillus nidulans*.

Introducción. La esterasa StcI forma parte de la vía de biosíntesis de esterigmatocistina en *A. nidulans*, el cual es un precursor de aflatoxinas. Realizamos la clonación y expresión en *Pichia pastoris* de esta enzima. El sustrato de la enzima en la vía de biosíntesis es el versiconal hemiacetal acetato, el cual contiene un grupo de bisdihidrofurano.

Se sabe que en los compuestos fenólicos acetilados, el grupo acetilo está correlacionado con la actividad biológica de los mismos, los cuales presentan actividades antitrombóticas y antiinflamatorias (1). Dentro de estos compuestos, los flavonoides son un grupo importante y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Sus propiedades biológicas, farmacológicas y medicinales han sido revisadas ampliamente (2). Sin embargo, el uso de los mismos se encuentra limitado por su baja solubilidad y estabilidad en fases acuosa y no-polar. Para mejorar estas propiedades se ha buscado la modificación de su estructura por vía química, enzimática y químico-enzimática. La vía química no representa un proceso regioselectivo y conduce a la pérdida del poder antioxidante del polifenol (3). La vía enzimática es más regioselectiva, lo cual permite conservar el poder antioxidante, mejorando la solubilidad y estabilidad del flavonoide.

En el presente trabajo se evaluó la especificidad y regioselectividad de la esterasa StcI con acetilados de diferentes grupos de sustratos divididos en: hidroxicinámicos (acetilados de ferúlico, cumárico, caféico y cafeato de bornilo), naftoles (α y β -naftil acetato), núcleos esteroidales (acetilado de colesterol y amirina), flavonoides (quercetina, hespertina, catequina y epicatequina), monofenoles (acetilado de TBHQ, vainillina, *p*-nitrofenol y diacetilado de hidroxiquinona) y ácido kojico).

Metodología. *Clonación y expresión-* El gen *stcI* se amplificó por PCR a partir de cDNA obtenido del aislamiento de mRNA. Se subclonó dentro del vector pPICZ α -B, que contiene un promotor inducible por metanol. El vector obtenido pPICZ α stcI se linearizó y se utilizó para transformar *P. pastoris* X33. Las clonas *Pichia* X33/pPICZ α stcI se crecieron a 30°C en medio BMGY y se transfirieron al medio BMMY, se crecieron e indujeron con 0.5% de metanol por día, tras lo cual se cuantificó la actividad de esterasa en el sobrenadante con α -naftilacetato.

Acetilación de compuestos- Se realizó por métodos convencionales.

Ensayo enzimático- Los sustratos se disolvieron en 1 mL de acetona y se agregaron 400 μ L de enzima en buffer de

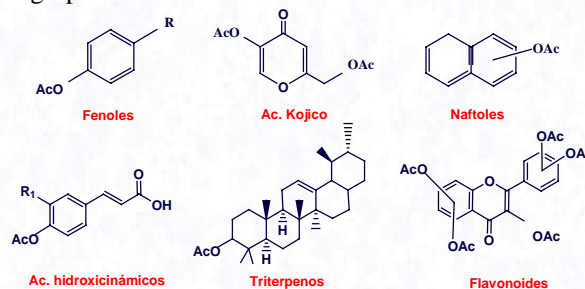
fosfatos 0.1M, pH 7.5 y 2 mL adicionales de buffer. Se incubaron por 48hrs a 300rpm.

Extracción de compuestos e identificación cualitativa- La reacción se detuvo y se agregó 1mL de acetato de etilo, se extrajeron los productos y se observaron por CCF revelada con DPPH y Sulfato Cérico.

Caracterización de productos por métodos espectroscópicos- Se realizó espectrometría de masas (ESI), 1 H RMN y se compararon con estándares auténticos.

Resultados y discusión.

En la siguiente figura se observa la estructura general de cada grupo de sustratos.



En CCF se observó que la enzima fue capaz de hidrolizar eficientemente el diacetilado de hidroxiquinona, ésteres de *p*-nitrofenol, α -naftil acetato, todos los flavonoides y ácido kojico. Los productos obtenidos fueron evaluados por espectrometría de masas. La desacetilación de los flavonoides y ácido kojico no fue total, generando compuestos parcialmente acetilados que conservaron el poder antioxidante.

Conclusiones. La desacetilación parcial realizada por la enzima sobre flavonoides y ácido kojico generó productos que conservan el poder antioxidante y muy posiblemente con mejores propiedades de estabilidad y solubilidad. Sería interesante realizar la inmovilización de la enzima para llevar a cabo la desacetilación parcial de los flavonoides evaluados. También se puede realizar la esterificación de flavonoides con grupos de cadena mas larga como ácido oleico ó láurico, que aumente solubilidad de éstos en fases no-polares.

Bibliografía.

1. Fragopoulou E, *et. al.* (2007). Biological activity of acetylated phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 55(1):80-9.
2. Di Carlo, *et.al.* (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* 65(4):337-53.
3. Rice-Evans, *et.al.* Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 1996;20(7):933-956.