

BIOTRANSFORMACION DE QUERCETINA EN *Senna angustifolia* MEDIADA POR PEROXIDASAS

Daniel Arrieta Baez^{1,2}; Rosa Roman³, Manuel Jiménez Estrada²; Rafael Vazquez Duhalt³.

¹Facultad de Química; ²Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria. Coyoacán, 04510. México. Fax 56225345; ³Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad s/n, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. 62221. e-mail: danielarrieta@hotmail.com

Palabras clave: *biflavonoide*, *Senna angustifolia*, *Peroxidasas*.

Introducción. Diversos compuestos diméricos han sido detectados en especies de *Senna*, siendo los más importantes los dímeros de antraquinonas y de flavonoides. La biogénesis de estos compuestos no ha sido esclarecida totalmente, argumentándose en algunos casos, que no son propiamente productos naturales, sino artefactos formados durante su extracción (1).

Estudios realizados por Botta y colaboradores (2) en la biotransformación de chalconas, refuerzan las hipótesis de la participación de las peroxidasas en la formación de biflavonoides, a través del acoplamiento oxidativo fenólico.

Metodología. PURIFICACION DE LA PEROXIDASA DE *S. angustifolia*. 5 gr. de hojas frescas de *S. angustifolia* fueron homogenizadas en buffer de fosfatos (60mM), pH 6. El extracto crudo fue objeto de tratamiento con sulfato de amonio a una concentración del 80%. La fracción con actividad de Peroxidasa fue objeto de cromatografías de intercambio iónico, utilizando Celulosa DE52, eluidas con un gradiente de NaCl, 0 a 1 M, en buffer de fosfatos 10 mM (pH 6). Las fracciones con mayor actividad fueron objeto de otras dos separaciones cromatográficas en columnas High Q y High S. La electroforesis en SDS-PAGE, usando 8% de acrilamida, demostró la pureza de la preparación enzimática.

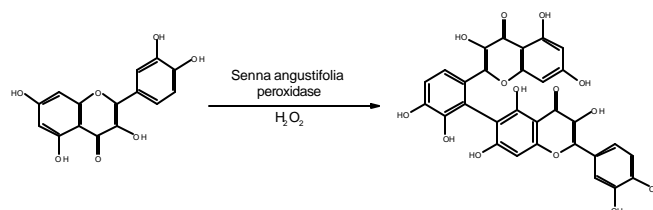
Análisis Cinético: La oxidación de quercetina por la peroxidasa purificada de *S. angustifolia* fue monitoreada por cambios en la absorbancia a 365 nm, 25 °C. Las reacciones siguen un decaimiento lineal en los primeros segundos de reacción, ajustándose a la ecuación característica de las peroxidasas: $v/2[E]_0 = A[H_2O_2]/(B + [H_2O_2])$ (3). Las constantes k_1 y k_3 para la concentración del sustrato fueron 0.11 y 0.4 mM, mientras que para el H₂O₂ fueron 0.05 y 0.02 mM.

Biotransformaciones: La biotransformación de Quercetina se realizó a 25 °C en 1.1 mL de reacción que contenía buffer de fosfatos 60 mM, pH 6.0; H₂O₂ (1 mM), 5 µL de Quercetina 4 mM y Peroxidasa (Peroxidasa de *S. angustifolia* y Horseradish Peroxidase, HRP). La reacción fue monitoreada por HPLC equipado con una columna de fase reversa C₁₈, midiendo la disminución del pico del sustrato a A₂₅₅.

Resultados y Discusión. Para determinar la participación de las peroxidasas en la biosíntesis de biflavonoides, se purificó una peroxidasa de *S. angustifolia*, para ser probada por los precursores del dímero de quercetina. El peso molecular de

la peroxidasa, fue una proteína de 72,000 Da. La quercetina fue tratada con la peroxidasa de *S. angustifolia* y de la enzima de rábano blanco (HRP), en presencia de H₂O₂, observándose una transformación enzimática. Con ambas peroxidasas se observaron los mismos productos de reacción, por lo que para obtener suficiente producto, 100 mg del flavonoide fueron biotransformados con HRP y H₂O₂. El producto principal fue aislado como un polvo amarillo y caracterizado por RMN de H, y su peso molecular fue determinado por IE. Ambas espectroscopias sugieren la presencia del biflavonoide C2'-C6'-biquercetina.

El análisis cinético realizado con la peroxidasa de *S. angustifolia*, muestra que dicha enzima sigue una cinética tipo Michaelis-Menten, de acuerdo con el mecanismo aceptado para la reacción de peroxidasas.



Conclusiones. De nuestros resultados, podemos concluir que la peroxidasa aislada de *Senna angustifolia* oxida eficientemente al flavonoide quercetina, produciendo el dímero C2'-C6'-biquercetina. La capacidad de la peroxidasa purificada para sintetizar el biflavonoide, sugiere la participación de las peroxidasas en la ruta biosintética de los biflavonoides.

Bibliografía

1. Abegaz, B.H.; Bezabeh, M.; Alemayehu, G. Duddeck, H. *Phytochemistry*, 35(2), 465-466, 1994.
2. Botta, B., Vinciguerra, V., De Rosa, M.C., Scurria, R., Carbonetti, A., Ferrari, F., Monache, G.D., Misisi, D. *Heterocycles*, 29 (11), 2175-2183, 1989.
3. Rasmussen, C.B., Dunford, H.B. and Welinder, K.G. 1995. Rate Enhancement of Compound I Formation of Barley Peroxidase by Ferulic Acid, Caffeic Acid, and Coniferyl Alcohol. *Biochemistry*, 34, 4022-4029.