

00591

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“ACOPLAMIENTO OXIDATIVO DE
9,10-ANTRAQUINONAS CATALIZADAS POR
PEROXIDASAS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
**DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOQUÍMICAS)**

PRESENTA:

M. EN C. DANIEL ARRIETA BAEZ

ASESOR PRINCIPAL: DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
ASESOR EXTERNO: DR. RAFAEL VÁZQUEZ



MEXICO, D. F.

ABRIL 2005

m 346671



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Manuel Jiménez Estrada en el laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, y del Dr. Rafael Vazquez Duhalt en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que me evaluó y asesoró durante el desarrollo de la Tesis estuvo conformado por los Dres: Manuel Jiménez Estrada, Rafael Vazquez Duhalt y Edmundo Brito de la Fuente.

El proyecto fue apoyado parcialmente por PAEP-UNAM (103302). Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir el formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: DANIEL ADRIETO BAEZ

FECHA: 9-Ago-2005

FIRMA: pp. [Firma]

AGRADECIMIENTOS

- A MI ESPOSA Patricia Cano Sánchez, por todo lo que has significado y significas para mí, por ser mi impulsora de sueños y mi despertar de las más dulces realidades, te amo de aquí a la luna dos vueltas de ida y vuelta y de regreso.
- A MI HIJO Angel Arrieta Cano, a mi pequeño priscioso por tu ternura, tu mirada y tu preciosa sonrisa, que hace que todo el tiempo a tu lado la luz de la esperanza se mantenga iluminada.
- A MI MADRE Martha Baez, por enseñarme con tu ejemplo, como salir delante de los momentos mas difíciles Todo mi amor y mi cariño a mi ejemplo de vida!!!!
- A MIS TIAS Judith y en memoria de mi tia Angela Arrieta Arroyo, siempre con mucho amor y mucho cariño.
- A LA MEMORIA DE MIS PADRES: David Arrieta Arroyo y Adán López Juárez.
- A MIS HERMANOS: Judith, Adán, Emiliano, Alfredo y Martha, esperando seguir en las buenas y en las malas.
- A MIS SUEGROS: Dr. Rafael R. Cano y Profa. Carmen Sanchez de Cano.
- A MIS PRIMOS: Paco, Martha, Cheli, Benito, etc. y a sus familias, gracias por seguir siendo parte de mi.
- A TODOS MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DE SIEMPRE: Alejandro, Dionisio, José, Maury, Lupita B., Toby, Pako, Efrén, Rubén, Lupita C., Angeles, Carlos ... y muy en especial a mi queridísima amiga Gaby , gracias por su amistad y apoyo.

Con especial afecto y agradecimiento al Dr. Manuel Jiménez Estrada y al Dr. Rafael Vázquez por sus enseñanzas y consejos para la realización de este proyecto, como siempre, espero haber cumplido con las expectativas que tenían de mi. Gracias.

Con mucho cariño para Rosa y Raunel, por su valiosa ayuda en la parte técnica y por los buenos momentos que pasamos en el Instituto de Biotecnología.

Al personal técnico de Espectroscopia y Biblioteca del Instituto de Química de la UNAM, con agradecimiento.

INDICE

Abstract	4
Resumen	5
1. INTRODUCCION	6
1.1 BIANTRAQUINONAS	7
1.1.1. Propiedades Biológicas	7
1.1.2. Biogénesis	9
1.1.3. Separación e identificación de los compuestos antraquinoides	13
1.1.3.1. Análisis de Antraquinonas	13
1.1.3.2. Espectros de absorción	15
1.1.3.3. Espectros de Masas	15
1.2. BIFLAVONOIDES	16
1.2.1. Actividad biológica	16
1.2.2. Biosíntesis	18
1.3. PEROXIDASAS Y POLIFENOLOXIDASAS	20
1.3.1. Peroxidasas	20
1.3.1.1. Diversidad y conservación de las peroxidasas de las plantas	22
1.3.1.2. Purificación y caracterización de las peroxidasas	22
1.3.2. Ensayos enzimáticos	23
1.3.2.1. Análisis cinético	23
1.3.3. Lacasas	24
1.3.3.2. Lacasas involucradas en la lignificación	24
1.3.3.3. Sistema de acoplamiento oxidativo fenólico a través de las lacasas	25
1.4. ACOPLAMIENTO OXIDATIVO FENOLICO	26
◆ ◆ Justificación	28
◆ ◆ Objetivo General	29
◆ ◆ Objetivos Particulares	29
2. MATERIAL Y METODOS	30
3. RESULTADOS	34
3.1. Acoplamiento oxidativo fenólico de las antraquinonas con las lacasas	36
3.1.1. Análisis de los compuestos obtenidos en la oxidación con las lacasas	38
3.1.1.1. Alizarina	38
3.1.1.2. Quinizarina	39
3.2. ACOPLAMIENTO OXIDATIVO DE LAS ANTRAQUINONAS CON LASPEROXIDASAS	39
3.2.1. Obtención de la peroxidasa de Senna angustifolia	39
3.2.2. Acoplamiento oxidativo fenólico catalizado por peroxidasas	41
3.2.2.1. Emodina	42
3.2.2.2. Alizarina	43
3.2.2.3. Purpurina	43
3.2.3. Análisis de los productos de reacción de alizarina	44
3.2.4. Análisis de los productos de reacción de purpurina	45
3.2.5. Análisis de la reacción con las antracenas de quinizarina y alizarina	45
3.3. ACOPLAMIENTO OXIDATIVO DE LA QUERCETINA CON LAS PEROXIDASAS	48

3.3.1.	Análisis de los productos de reacción de quercetina	48
3.4.	ANALISIS CINETICO	49
4.	DISCUSION DE RESULTADOS	54
4.1.	Acoplamiento oxidativo mediado por lacasas	55
4.1.1.	Alizarina	56
4.1.2.	Quinizarina	58
4.2.	Acoplamiento oxidativo mediado por peroxidases	60
4.2.1.	Alizarina	62
4.2.2.	Purpurina	63
4.3.	Acoplamiento oxidativo fenólico con antracenas	67
4.4.	Acoplamiento oxidativo de quercetina mediado por peroxidases	70
	ANALISIS CINETICO	75
	CONCLUSIONES	77
	BIBLIOGRAFIA	82
	APENDICES	
	CROMATOGRAMAS Y ESPECTROS DE MASAS DE LA BIOCONVERSION DE ANTRAQUINONAS CON LACASA EN PRESENCIA DEL MEDIADOR ABTS	
	CROMATOGRAMAS Y ESPECTROS DE RMN Y MASAS DE LOS PRODUCTOS DE BIOCONVERSION DE ANTRAQUINONAS CON LAS PEROXIDASAS DE <i>S. angustifolia</i> Y LA PEROXIDASA DE RABANO PICANTE (HORSERADISH PEROXIDASE, HRP)	
	CROMATOGRAMAS Y ESPECTROS DE RMN Y MASAS DE LOS PRODUCTOS DE BIOCONVERSION DE ANTRACENONAS CON LA PEROXIDASA DE <i>S. angustifolia</i> Y LA PEROXIDASA DE RABANO PICANTE (HORSERADISH PEROXIDASE, HRP)	

ABSTRACT

Since hypericin and different dimers of flavonoids isolated from natural sources were studied regard to their inhibitory effects on different retrovirus, including HIV, bianthraquinones and biflavonoids have been considered potential antiviral agents. Many bianthraquinones isolated from *Rheum*, *Aloe*, *Rhamnus* and *Senna*, also exhibit laxative, antibiotic and antitumoral activities.

Studies using tracer techniques and specific incorporation of labeled compounds have suggested that monomeric anthraquinones are derived from octaketide, and in some cases have pre-anthraquinones precursors, namely anthracenones. There is some evidence that anthraquinones and anthracenones act as precursors to several dimeric anthraquinones, which may be formed by oxidative coupling. However, is still unclear whether bianthraquinones are either artifacts of isolation or true natural products.

Oxidative phenolic coupling contributes to the biogenesis of several natural products including alkaloids, flavonoids, lignins and antibiotics (vancomycin). It is possible that this enzyme-mediated mechanism could be involved in the biogenesis of bianthraquinones as well.

Peroxidases (EC 1.11.1.7) catalyze the oxidation of a large number of aromatic structures at the expenses of H_2O_2 . These enzymes have a variety of functions, but is still unknown whether peroxidases participate in bianthraquinone biosynthesis.

The aim of this work was to study the oxidative phenol coupling reaction of hydroxy-9,10-anthraquinones (rhein, emodin, aloe-emodin, alizarin, quinizarin and purpurin), two anthracenones (alizarin-anthracenone and quinizarin-anthracenone) and the flavonoid quercetin by a peroxidase purified from *Senna angustifolia* (SAP) and horseradish peroxidase (HRP).

A peroxidase has been isolated and purified from *Senna angustifolia*. The enzyme was purified by ion-exchange chromatography on high Q and high S columns. SDS-PAGE electrophoresis showed that the protein has a molecular mass of approximately 70 kDa.

Hydroxy-anthraquinones, hydroxy-anthracenones and the flavonoid quercetin were evaluated as substrate of SAP and HRP. Both peroxidases catalyzed the oxidation of alizarin and purpurin anthraquinones to the corresponding 3,3'-bializarin and the new compound 3,3'-bipurpurin, as well as the formation of 2,2'-biquinizarin from quinizarin-anthracenone. The K_{mapp} and V_{max} values of alizarin and purpurin were 97 and 95 μM , and 1.5 and 2.1 $\mu M \text{ min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$, respectively.

The enzyme was able to catalyze the oxidation of quercetin to the corresponding new biflavonoid 2',6''-biquercetin. The oxidation follows the accepted model for peroxidase oxidations, in which compound I and Compound II appear to be the main intermediates in the catalytic cycle ($k_1 = 3.1 \mu M^{-1} s^{-1}$ and $k_3 = 19.2 \mu M^{-1} s^{-1}$).

Our results suggest that HRP and the *Senna angustifolia* peroxidase oxidize alizarin and purpurin (1,2-dihydroxy anthraquinones) efficiently to produce the respective bianthraquinones, as well as the flavonoid quercetin. The ability of the purified peroxidase to synthesize a bianthraquinones from anthracenones or anthraquinones suggests that both intermediates could be used to produce these dimers. The data suggest that peroxidase plays a role in the biosynthesis of bianthraquinones and biflavonoids.

RESUMEN

Diversos compuestos diméricos derivados de las antraquinonas y los flavonoides han demostrado tener actividades biológicas entre las que destacan su actividad antiviral y antitumoral. Debido a ello, estos compuestos han sido considerados como potenciales agentes biológicos y diversos estudios se han enfocado en su aislamiento de las fuentes naturales y en sus mecanismos de acción. A la fecha se desconoce la biogénesis de las biantraquinonas y de los biflavonoides, y se menciona que en algunos casos, son compuestos formados durante los procesos de purificación y por lo tanto, no son productos naturales *per se*. Sin embargo, también se han encontrado evidencias de un acoplamiento oxidativo, posiblemente enzimático, en el cual podrían estar involucradas algunas enzimas como las polifenoloxidasas (lacasas) y las peroxidasas.

En el presente trabajo se estudiaron 6 compuestos hidroxiantraquinónicos (rheina, aloemodina, emodina, alizarina, quinizarina y purpurina), 2 compuestos hidroxiantracenos (alizarin-antracena y quinizarin-antracena) y el flavonoide quercetina, como sustratos para las peroxidasas.

Se aisló una enzima de *Senna angustifolia*. La enzima fue purificada por cromatografía de intercambio iónico y por electroforesis SDS/PAGE y se le determinó un peso molecular aproximado de 70 kDa.

Se evaluaron 4 hidroxiantraquinonas, 2 hidroxiantracenos, y el flavonoide quercetina como sustratos de la peroxidasa de *Senna angustifolia* y la peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidase; HRP). Estas peroxidasas fueron capaces de catalizar la oxidación de alizarina y purpurina en sus respectivos dímeros, 3,3'-bializarina y el nuevo compuesto 3,3'-bipurpurina, respectivamente. De la misma manera, alizarin-antracena y quinizarin-antracena fueron transformadas a sus correspondientes dímeros. Se determinaron los valores de K_{Mapp} y V_{max} para la alizarina y la purpurina que fueron 97 y 95 μM , y 1.5 y 2.1 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$, respectivamente.

El flavonoide quercetina fue transformado por ambas peroxidasas en el dímero correspondiente 2',6''-biquercetina, el cual se reporta como un compuesto nuevo. La oxidación sigue el modelo cinético aceptado para el mecanismo de acción realizado por las peroxidasas, en el cual el compuesto I y el compuesto II son los principales intermediarios en el ciclo catalítico ($k_1 = 3.1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_3 = 19.2 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

También se probaron estos sustratos con la enzima lacasa de *Coriopsis gallica*, pero no hubo transformación en ninguno de los casos.

Estos resultados indican la posible participación de las peroxidasas en la biogénesis de las biantraquinonas, las cuales se pueden obtener de compuestos antraquinoides o antracenos. La transformación del flavonoide quercetina en el correspondiente dímero evidencia la participación de las peroxidasas en su biogénesis.

1. INTRODUCCION

1.1. BIANTRAQUINONAS

Las biantraquinonas son compuestos diméricos producto de la oxidación de los monómeros de antraquinonas. Los primeros compuestos biantraquinoides fueron identificados debido a su acción laxante en los extractos de las especies de *Senna angustifolia* y *Senna acutifolia*. En 1949-1950, Stoll y sus colaboradores establecieron la estructura de estos compuestos como dímeros de rhein antrona (C 10-C 10') y se les dio el nombre de senósidos.¹ A partir de estos estudios, se aislaron nuevos senósidos y se identificaron sus estructuras como aglicones diméricos de rheina, aloé-emodina y emodina (comp. 1-4).^{2,3}

En los últimos 15 años, los estudios fitoquímicos de especies de *Senna sp.* han llevado al aislamiento de otro tipo de biantraquinonas. Kitanaka y Takido⁴ publicaron en 1982 el primer aislamiento de los 5,7'-derivados diméricos de antronas y en los últimos años, Abegaz et al.^{5,6,7} ha realizado importantes estudios sobre el aislamiento y la caracterización de los compuestos diméricos de las antraquinonas. Dentro de estos estudios destaca el aislamiento de las 1,4'-biantraquinonas; las 10,7'-biantraquinonas, los dímeros de 1,10'-antraquinonas, los dímeros de antraquinonas con antracenas (comp. 5-8). La mayor parte de estos aislamientos han sido realizados en las especies del género *Senna*.

1.1.1. PROPIEDADES BIOLÓGICAS

Los extractos de *Senna acutifolia* y *Senna angustifolia* han sido estudiados debido a las propiedades laxantes que se les atribuían. Dichos estudios demostraron que los efectos laxantes se debían a la presencia de senósidos.¹ Actualmente, la mayor parte de los productos comerciales con acción laxante contienen estos compuestos en sus formulaciones. Sin embargo la forma por la cual ejercen su acción laxante aún no está clara y se plantean tres mecanismos que podrían estar involucrados: 1) Por sus propiedades hidrofílicas u osmóticas, los senósidos pueden causar retención de líquido en el contenido colónico, aumentando el volumen y la blandura de las heces, facilitando así su tránsito. 2) Los senósidos pueden actuar, en forma directa o indirecta, sobre la mucosa colónica para disminuir la absorción neta del agua y del NaCl. 3) Los senósidos pueden aumentar la motilidad intestinal produciendo una disminución de la absorción de la sal y del agua secundaria a la disminución del tiempo de tránsito. Sin embargo, el mecanismo de acción real de los senósidos aún es tema de estudio.^{8,9}

Los estudios biológicos de los extractos de *Senna* revelan que poseen propiedades laxantes, analgésicas, antipiréticas, antimicrobianas, anticancerígenas, antivirales, etc. La presencia de las antraquinonas y sus derivados en estos extractos resultaron ser responsables de las actividades laxantes y al igual que los flavonoides, presentan actividad anticancerígena y antiviral.

La hipericina (Fig. 1; 8), una quinona policíclica aislada de fuentes naturales, ha sido estudiada en los últimos años como un inhibidor de la infectividad de varios retrovirus, incluyendo el virus de la inmunodeficiencia humana. Estos estudios han abierto un camino importante para el estudio de los derivados de antraquinonas como prototipo de agentes antiretrovirales.^{10,11}

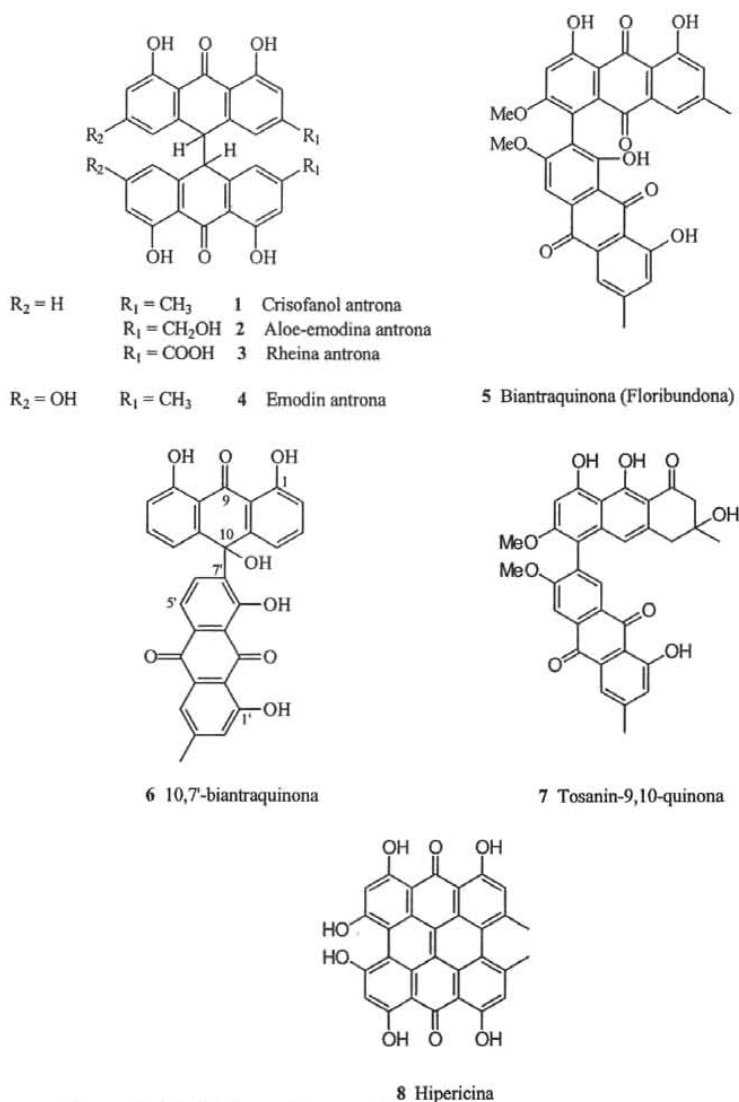


Figura 1. Senósidos y dímeros de antraquinonas más comunes.

Las biantraquinonas han mostrado actividad contra los retrovirus no humanos y también contra el VIH I (virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1) en los linfocitos.¹² La biantraquinona de emodina tiene actividad antiviral contra una cepa especial de citomegalovirus humano (CMVH), AD-169.¹³ En otros estudios realizados con extractos de *Rheum officinale*, *Aloe barbadensis*, *Rhamnus frangula* y *Senna angustifolia*, se demostró que la presencia de las biantraquinonas de aloe-emodina presentaban efectos sobre la

infectividad de los virus *herpes* simple tipo 1 y tipo 2, el virus *varicela-zoster*, virus *pseudorabies*, virus *influenza*. Sin embargo no hubo efecto sobre el *adenovirus* y el *rhinovirus*.¹⁴

Los mecanismos por los cuales este tipo de compuestos inactiva la infectividad de los virus aún no han sido esclarecidos. Sin embargo, algunos estudios demuestran que afectan al ciclo de replicación en al menos dos puntos: 1) En el proceso de ensamble de viriones intactos en las células infectadas. La microscopía electrónica ha demostrado que las células infectadas con virus tratadas con hipericina, producen núcleos ensamblados anormalmente o partículas inmaduras. Los viriones liberados no tienen actividad de transcriptasa inversa. 2) La hipericina (8) y sus derivados inactivan el ensamble del retrovirus actuando directamente sobre la transcriptasa inversa (VIH-1 RT).^{15,16} Estos estudios se han relacionado con los efectos que producen los biflavonoides sobre los mismos virus, encontrando el mismo efecto sobre la transcriptasa inversa del VIH.¹⁷

Existen evidencias de que un ADN dañado es un factor importante en la carcinogenesis. Por lo tanto, en teoría, el camino más efectivo para evitarlo es reducir las mutaciones en el material genético. Por ello, diferentes compuestos han sido evaluados para determinar el efecto inhibitorio con respecto a compuestos que pueden ser mutagénicos y/o carcinogénicos. Diferentes extractos acuosos de *Cassia tora* fueron probados en el estudio de daño inducido de ADN por benzo[a]piranos, un hidrocarburo policíclico aromático presente en el medio ambiente y comúnmente observado en el humo de cigarrillos. El grado de actividad de dichos extractos fue relacionado con la presencia de antraquinonas, las más comunes como el crisofanol, la emodina y la rheina, demostraron una significativa actividad antigenotóxica en el ensayo cometa.^{18,19}

Debido a estos resultados, estudios recientes de plantas que contienen antraquinonas, biantraquinonas y otros compuestos antraquinoides han demostrado la utilidad de fraccionamientos bio-dirigidos contra diferentes tipos de cáncer.^{9,19,20} Así mismo, nuevos estudios de estructura-actividad han revelado que este tipo de compuestos posee un importante potencial como agentes anticancerígenos.^{21,22,23,24}

Los resultados obtenidos con los diferentes compuestos dimericos (hipericina, biantraquinonas y biflavonoides) que inhiben los retrovirus a través de mecanismos no convencionales presentan un valor potencial terapéutico que podría ser explorado en enfermedades como el SIDA. Sin embargo, los estudios de la actividad antiviral de las biantraquinonas son escasos y éstos sólo se han sido realizados con los compuestos obtenidos de fuentes naturales. A la fecha no se han realizado síntesis orgánicas de estos dímeros que permitan obtener diferentes biantraquinonas para conocer el mecanismo de acción contra estos virus. Esto se debe a que los métodos para sintetizarlas, como se analizan posteriormente, comprenden técnicas que utilizan metales y condiciones de reacción drásticas (altas temperaturas, etc.) que no permiten obtener un buen rendimiento de los dímeros.

1.1.2. BIOGENESIS DE LAS ANTRAQUINONAS

Al igual que otros metabolitos secundarios, las quinonas son derivados de intermediarios claves, principalmente acetato, shiquimato y mevalonato, por una serie de reacciones las cuales permiten la formación de compuestos benzenoides.

La ruta biosintética de estos compuestos aún no es muy clara. La mayor parte de las antraquinonas derivadas por la vía del acetato conforman patrones tipo emodina (Fig. 2; 10) y se considera que son sintetizadas de una cadena de policétidos de 8 unidades de

acetato. Numerosas variaciones de esta estructura básica resultan de la O-metilación, oxidaciones de la cadena lateral, la cloración y la dimerización.^{25,26}

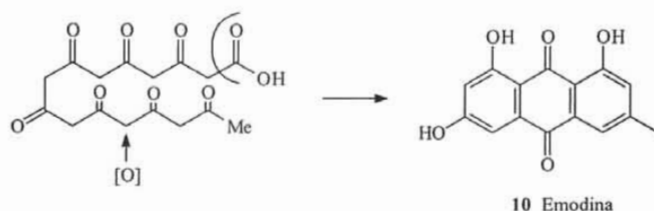


Figura 2. Formación de la emodina por medio de un policétido

El aislamiento de algunas antraquinonas (emodin antrona, principalmente) sugiere que la biosíntesis de las antraquinonas, tiene como paso final la oxidación de estos precursores. La caracterización de la emodin-antrona oxigenasa ha venido a reforzar esta tesis. Esta enzima cataliza la fijación del oxígeno molecular en la emodin antrona (Fig. 3; 9) para dar la antraquinona emodina. Esta enzima fue detectada en *Aspergillus terreus*, asociada a la membrana.²⁷ Otras enzimas como la emodin desoxigenasa,^{28,29} la cual cataliza la reducción de la emodina en crisofanol (Fig. 3; 11) y la emodina-O-metiltransferasa,³⁰ la cual cataliza la metilación de la emodina, están involucradas en las transformaciones finales de las antraquinonas.

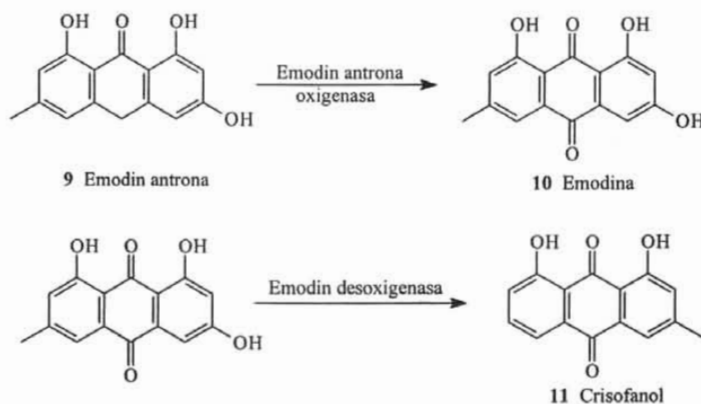


Figura 3. Enzimas involucradas en la etapa final de la biogénesis de antraquinonas

Los estudios que fueron realizados para elucidar la biosíntesis de la macrosporina (Fig. 4; 12), un metabolito de *Alternaria porri*, demostraron que, al incorporar acetatos marcados al medio de cultivo, éstos formaban octacétidos. Los octacétidos se condensan "cola con cabeza" seguidos por la pérdida de un grupo carboxilo en la unidad terminal correspondiente al C-8. La introducción de un grupo metilo proveniente de la metionina propician la formación de la altersolanona (Fig. 5; 14), una tetrahidroquinona que puede

ser dimerizada en la posición C-5 para formar los compuestos llamados alterporrioles (Fig. 4; 13).^{30,31}

Existen evidencias para la formación de los dímeros de antraquinonas a partir de compuestos pre-antraquinónicos.^{32,33} En la biosíntesis de los alterporrioles, los precursores pre-antraquinoides no fueron detectados en un análisis por HPLC. Por lo que se piensa que los dímeros se forman directamente a través del acoplamiento oxidativo entre antraquinonas.

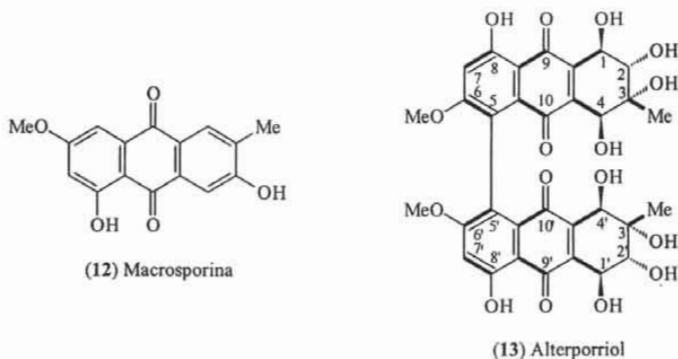


Figura 4. Estructura química de la macrosporina y el alterporriol

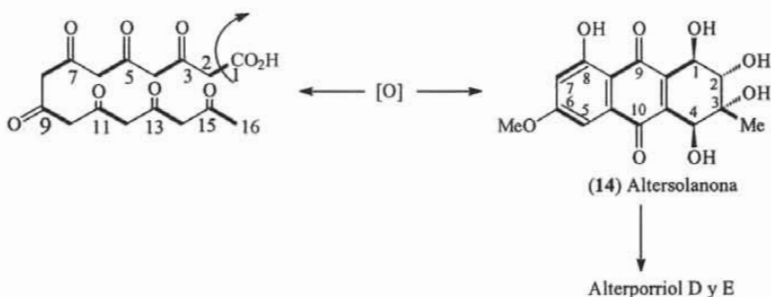


Figura 5. Biogénesis de alterporrioles

La dihidroantracena torosacrisona (Fig. 6; 15), un metabolito activo de *Senna torosa*, fue aislado en 1987 del hongo *Dermocybe splendida*. Se elucidó la biogénesis de esta dihidroantracena incorporando acetato de sodio [$2\text{-}^{13}\text{C}$], acetato de sodio [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$] y metionina [$\text{Me-}^{13}\text{C}$]. El patrón de incorporación concuerda con la formación de torosacrisona a partir de un precursor octacético que se ensambla "cabeza con cola" como se presenta en el siguiente esquema.

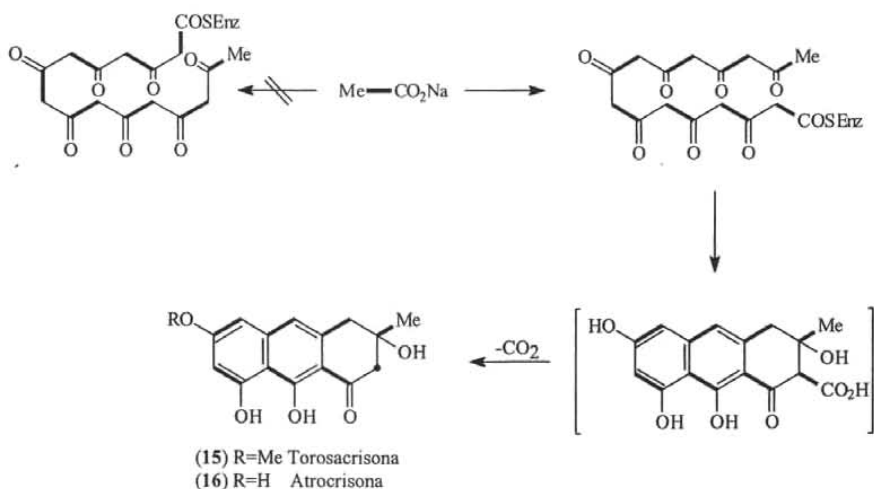


Figura 6. Biogénesis de la torosacrisona y de la atrocrisona

Se piensa que los metabolitos torosacrisona y atrocrisona (16) están implicados en la biosíntesis de un gran grupo de compuestos diméricos aislados de *Cortinarius*, *Dermocybe* y *Tricholoma*. El acoplamiento oxidativo entre estas dihidroantracenas puede dar lugar a la formación de varios compuestos diméricos a través de hidroxilaciones, metilaciones, deshidrataciones (antronas) y oxidaciones (antraquinonas). Estos cambios pueden estar involucrados en uno o en ambos monómeros. Sin embargo no se descarta que estos compuestos sean artificios formados durante su aislamiento, como sucede con la oxidación y subsecuente fotoacoplamiento de la hipericina.³⁴

De lo anterior podemos sacar algunas observaciones importantes encaminadas a la elucidación de la biogénesis de los compuestos diméricos de antraquinonas:

- Los procesos de biogénesis de antraquinonas sugieren que la formación de dímeros puede ser a través de compuestos pre-antraquinoides, como las antracenas. Una vez formados los dímeros estos son objeto de otras transformaciones.
- Las antraquinonas pueden ser objeto de un acoplamiento oxidativo para dar los dímeros respectivos.
- En hongos como *Cortinarius*, *Dermocybe* y *Tricholoma*, los precursores de los dímeros parecen ser compuestos del tipo dihidroantracena. Estos compuestos son acoplados oxidativamente y los dímeros son objeto de otras reacciones para dar los dímeros de antraquinonas.
- Todos los precursores anteriormente mencionados presentan hidroxilos aromáticos de características fenólicas, que son importantes en el acoplamiento oxidativo enzimático o no enzimático.

1.1.3. SEPARACION E IDENTIFICACION DE LOS COMPUESTOS ANTRAQUINOIDES

Las quinonas son diacetonas insaturadas que, por reducción, se convierten en polifenoles los que fácilmente son regenerados por oxidación. Los pigmentos antraquinoides naturales tienen un colorido que va del amarillo pálido al negro y se conocen alrededor de 450 estructuras. Sin embargo, aunque se encuentran ampliamente distribuidas y presentan una gran variación estructural, tienen poca contribución en el color de las plantas superiores.

Las quinonas son coloreadas y contienen la misma base cromófora de la benzoquinona, la cual consiste de dos grupos carbonilos conjugados con dos dobles enlaces carbono-carbono (Fig. 7). Para su identificación, se dividen convenientemente en cuatro grupos: benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas y quinonas isoprenoideas (Fig. 7).

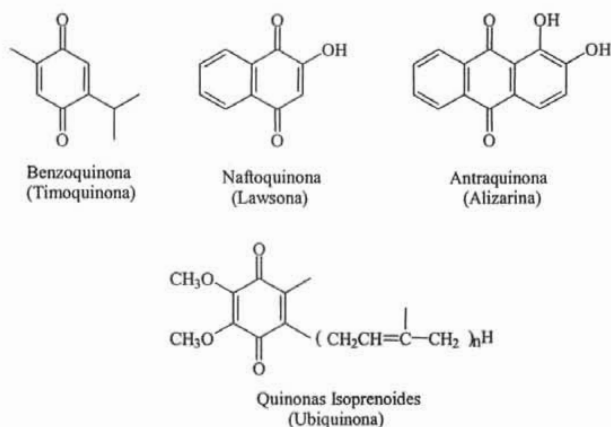


Figura 7. Clasificación de las quinonas

Los primeros tres grupos generalmente están hidroxilados, tienen propiedades "fenólicas" y se encuentran *in vivo* combinadas con azúcares y algunas veces en forma dimérica.^{25,26,35,36}

Las antraquinonas constituyen el grupo más numeroso de quinonas. Son frecuentes en las *Rubiaceae*, *Rhamnaceae*, *Polygonaceae* y *Caesalpinaceae*. Las cualidades colorantes y purgantes de estas familias se debe a las antraquinonas. La mayoría de ellas se encuentran hidroxiladas y con frecuencia en forma de glicósidos.³⁷

1.1.3.1. ANALISIS DE LAS ANTRAQUINONAS

La cromatografía en capa fina ha sido un método general para la detección y separación de las antraquinonas. Sin embargo, cuando se encuentran hidroxiladas, son muy polares y difíciles de separar a través de este método, ya que se requiere una mezcla compleja de solventes para hacerlas móviles. Debido a sus características cromóforas, no hay dificultad para detectarlas por medio de reacciones coloridas.

Las quinonas tienden a dar colores rojos o púrpuras con álcalis concentrados y con ácido sulfúrico, lo que se puede usar para su identificación. Para ello se realiza una cromatografía en papel o en capa delgada y se utiliza como agente cromogénico una solución metanólica al 0.5% de acetato de magnesio y se calienta a 90° durante 5 minutos. Cuando los hidroxilos están en posición *meta* la coloración es anaranjada, en *para* es púrpura y en *orto* es violeta.

Algunos otros agentes cromogénicos utilizados son soluciones de hidróxido de sodio al 3-5% y amoníaco, principalmente.^{35,36,38}

La presencia de antraquinonas se puede averiguar con la reacción de Bornträger. En ella se hierve, unos diez minutos, un poco de material con hidróxido de potasio al 2-5%. Se enfría la solución, se acidula y se extrae con benceno. La capa de benceno se separa y se sacude con un poco de solución de hidróxido de potasio. Si la fase de benceno se decolora y la alcalina se pone roja, hay quinonas. Cuando hay derivados de antrona, la fase alcalina puede quedar amarillenta con fluorescencia verde, para que enrojezca se le añade un poco de peróxido de hidrógeno al 3-6%.³⁵

La HPLC ha sido utilizado para separar compuestos antraquinoides, tales como los senósidos y los dímeros de antraquinona. Sin embargo, se requiere periodos largos de tiempo y no existe precisión en los estudios.^{38,39,40,41,42,43} Gupta *et al.* ha utilizado la fase reversa de HPLC para determinar y cuantificar senósidos de diferentes especies de *Cassia sp.* Utilizando como fase móvil metanol:agua:ácido acético:tetrahidrofurano (60:38:2:2, v/v/v/v), a una velocidad de flujo de 0.8 mL/min, en una columna μ -Bondapak C₁₈ (300 X 3.9 mm), los picos correspondientes a los senósidos A y B (fig. 8) tuvieron buena resolución con tiempos de retención de 9.88 y 7.22 min respectivamente. Los resultados obtenidos por el método descrito son eficientes y simples para la separación y determinación de senósidos A y B en extractos de planta.⁴⁴

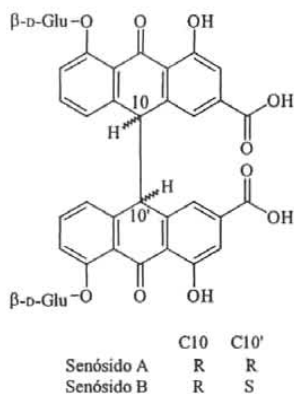


Figura 8. Senósidos A y B

En los estudios realizados por Reif en 1996 con preparaciones de frutos y hojas de *Senna angustifolia* y *Senna acutifolia*, se describe un método de HPLC el cual permite la determinación de 1,8-dihidroxi-antraquinonas y de 17 biantrones.⁴⁵

Se han utilizado también algunos otros métodos de análisis como la cromatografía de gases. Para llevar a cabo el estudio de cromatografía de gases, se utilizó hexametildisilano y trimetilclorosilano para derivatizar las antraquinonas. Las antraquinonas que no presentan hidroxilos tienen el menor tiempo de retención. En las dihidroxiantraquinonas, las α,α presentan tiempos de retención mas cortos que las α,β -dihidroxiantraquinonas.³⁶

1.1.3.2. ESPECTROS DE ABSORCION DE LAS QUINONAS

La diversidad de las quinonas naturales se refleja en sus espectros de absorción en la región ultravioleta. Así, las benzoquinonas absorben intensamente entre 240-290 nm ($\epsilon=12,000-2,000$) con una absorción débil entre 380-400 nm. Las naftaquinonas, antraquinonas y homólogos muestran espectros con varias absorciones. Así las primeras dan señales a 240-290 nm ($\epsilon= 12,000-18,000$) y a 400-500 nm ($\epsilon= 500-5,000$). Las antraquinonas absorben a 240-300 nm ($\epsilon= 9,000-3,000$), 300-350 nm ($\epsilon= 3,000-6,000$) y 400-500 nm ($\epsilon= 2,000-9,000$). Los hidroxilos tienen fuerte efecto batocrómico. El efecto batocrómico inducido por la adición de álcali puede usarse como un criterio adicional de identificación (Tabla 1).^{35,36}

Tabla 1: Propiedades espectrales de diferentes antraquinonas.

Antraquinona	nm (EtOH)
Emodina	223, 254, 267, 290, 440
Crisofanol	225, 258, 279, 288, 432
Physcion	226, 255, 267, 288, 440
Aloe-emodina	225, 258, 279, 287, 430
Rheina	230, 260, ---, ---, 432
Acido emódico	227, 252, 274, 290, 444

1.1.3.3. ESPECTRO DE MASAS

Es usual que en el espectro de masas de las antraquinonas se observen señales intensas a M-28 y M-56, correspondiente a la pérdida de una o dos moléculas de monóxido de carbono.

En el caso de algunos dímeros de antraquinonas el ion molecular no se observa, sin embargo, además de las señales correspondientes a M-28 y M-56 (Fig. 9), se pueden observar señales por pérdida de agua correspondientes a M-18.^{35,46}

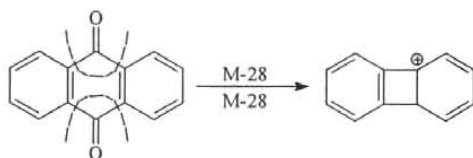


Figura 9. Fragmentación típica de una antraquinona por medio de impacto electrónico

En raras ocasiones, se puede observar la adición de dos átomos de hidrógeno a iones moleculares. Sobre el modo de formación de tales iones, $M+2$, se sabe, sin embargo muy poco puesto que la intensidad relativa se reproduce muy mal y no depende de la presión de una forma característica.⁴⁶ En las quinonas, estos iones se atribuyen a reducciones químicas a hidroquinonas sobre superficies catalíticamente activas.

1.2. BIFLAVONOIDES

A partir de la identificación del virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) como el agente causante del SIDA, diferentes grupos, en el ámbito mundial, se han enfocado en el descubrimiento de nuevas drogas para la investigación de tratamientos seguros y efectivos contra la infección del VIH. En el curso de estas investigaciones, los biflavonoides han mostrado actividad anti-VIH-1 RT.¹⁷

A los biflavonoides se les ha encontrado otros importantes efectos biológicos como vasodilatadores, actividad hepatoprotectiva, antitumorales y otros.^{47,48} De las hipótesis de su formación se maneja el acoplamiento oxidativo fenólico, probablemente enzimático. En este proyecto se propone utilizar enzimas denominadas "polifenol oxidasas" como responsables de la biogénesis de los biflavonoides. Así mismo, muchos metabolitos secundarios presentan enlaces C-C ó C-O característicos de un acoplamiento fenólico. Las enzimas oxidativas, como las peroxidasas, pueden constituir una tecnología alternativa para la obtención de estos productos.

1.2.1. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los primeros biflavonoides, una biflavona, fue aislada en 1929 por Furukawa del *Ginkgo biloba* L., como un pigmento amarillo.⁴⁹ Desde entonces se han aislado aproximadamente 100 biflavonoides. Se han descrito una variedad de actividades biológicas para estos compuestos, entre ellas, como causantes de vasodilatación periférica, estimulan la síntesis de RNA en hepatocitos de rata (la garcinikolina),⁴⁷ efecto hipoglucémico, son citotóxicos contra cultivos celulares de carcinoma de la boca (KB), inhiben la expresión del gen del virus Epstein-Barr, efectos inhibitorios de la lipoperoxidación, así como actividad anti-espasmogénica, hepatoprotectiva, antimicrobial y antiviral.^{50,51,52}

Algunos biflavonoides han sido evaluados por su capacidad inhibitoria del *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y ha sido considerados como nuevos agentes antituberculosos. Estos compuestos han demostrado una inhibición del 85 al 97% de dicha cepa.⁵³

En fechas recientes se han descrito nuevos compuestos biflavonoides con actividad biológica importante. Lin *et al*, ha descrito la actividad anti-HIV-1 RT de 11 biflavonoides aislados de *Rhus succedanea* y *Garcinia multiflora*. La importancia de ese estudio,

ademas de la descripción de los compuestos nuevos, radica en el estudio de la relación estructura-actividad de estos biflavonoides: biflavonoides contruidos de unidades de flavanona-flavona, por medio de enlace I3-II8 fueron de debil a moderadamente activos y las biflavanonas compuestas de unidades de naringenina con enlace I 6-II 6 fueron completamente inactivas (Fig. 10).⁴⁷

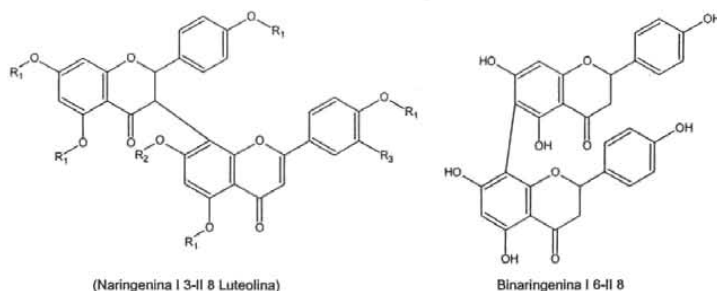


Figura 10. Estructura química de los biflavonoides

La metilación de los grupos hidroxilo de los biflavonoides resultó en una disminución de la actividad. La metilación del grupo 7''-hidroxilo del compuesto GB-1^a-7''-glucósido fue especialmente importante para la actividad anti HIV-1 RT.

Ito *et al.*, aisló en 1999⁵⁴ un nuevo biflavonoide llamado pancibiflavonol de *Calophyllum panicflorum* (Fig. 11), ademas de otros seis ya conocidos. Estos biflavonoides exhiben una actividad inhibitoria significativa contra el acetato número 13 del 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) inducido por el virus Epstein-Barr en la activación temprana de antígeno en células Rajá. Es decir son una importante familia de promotores antitumorales.

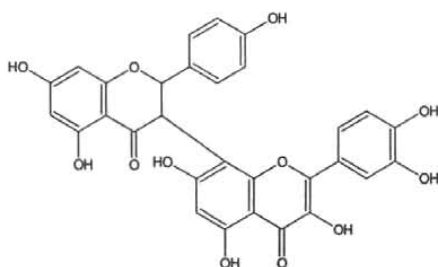


Figura 11. Estructura química del biflavonoide pancibiflavonol

Estos biflavonoides se han agrupado en cuatro grupos de acuerdo a la presencia o ausencia del doble enlace en 2'' y un grupo hidroxilo en 3'' en la parte baja de la

estructura: (a) flavanona-flavonol, (b) flavanona-flavona, (c) flavanona-flavanol y (d) flavanona-flavanona (Fig. 12).

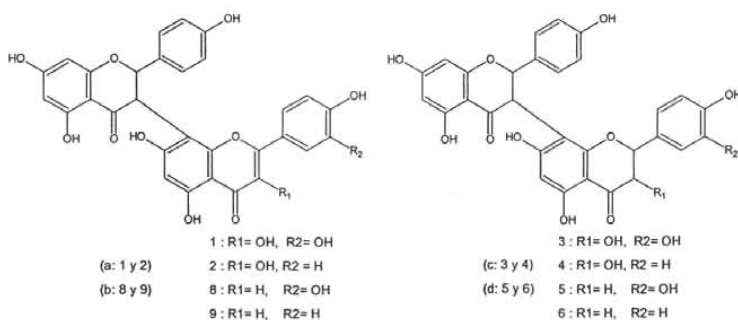


Figura 12. Estructura química de: (a) flavanona-flavonol, (b) flavanona-flavona, (c) flavanona-flavanol y (d) flavanona-flavanona

Los resultados obtenidos indican que los biflavonoides que presentan un enlace en C-2" tienen una mayor potencia inhibitoria que aquellos que no presentan este enlace. La presencia de un grupo hidroxilo en C-3" resultó ser no esencial para la actividad.

Cada vez es mayor el número de estudios que revelan la importancia de compuestos diméricos en actividades biológicas, como las anteriormente descritas. Sin embargo, los estudios de relación estructura-actividad se basan en los compuestos aislados. Su biogénesis aún permanece poco conocida, aunque se han presentado evidencias de un acoplamiento oxidativo fenólico, promovido por polifenol oxidasas.

Yuh-Meei Lin et al.,⁵² describió en 1999 que los biflavonoides, como la robustaflavona, amentoflavona, volkensiflavona y succedaneaflavanona demostraron una actividad antiviral significativa contra el virus de la influenza B. La robustaflavona y la amentoflavona también exhiben una actividad moderada en contra del virus de la influenza A, el HSV-1 y el HSV-2.

El estudio de la relación estructura-actividad de estos compuestos puede aportar información importante para el desarrollo de nuevos y más potentes compuestos antivirales.

1.2.2. BIOSINTESIS DE FLAVONOIDES

Los precursores directos de los flavonoides, 4-cumaril-CoA y malonil-CoA, y las interrelaciones biosintéticas de las principales clases de los flavonoides, se ilustran en la figura 13.

Ambos precursores de los flavonoides son derivados de los carbohidratos. El paso central de la biosíntesis, es la condensación de tres moléculas de malonil-CoA con un cumaril-CoA disponible.

En las especies de *Senna* la enzimología de los últimos pasos en el metabolismo de las biantraquinonas y los biflavonoides permanece incompleta. Aunque, al igual que las antraquinonas, estos compuestos tienen características fenólicas que podrían involucrar un acoplamiento oxidativo fenólico, esto aun no ha sido demostrado.

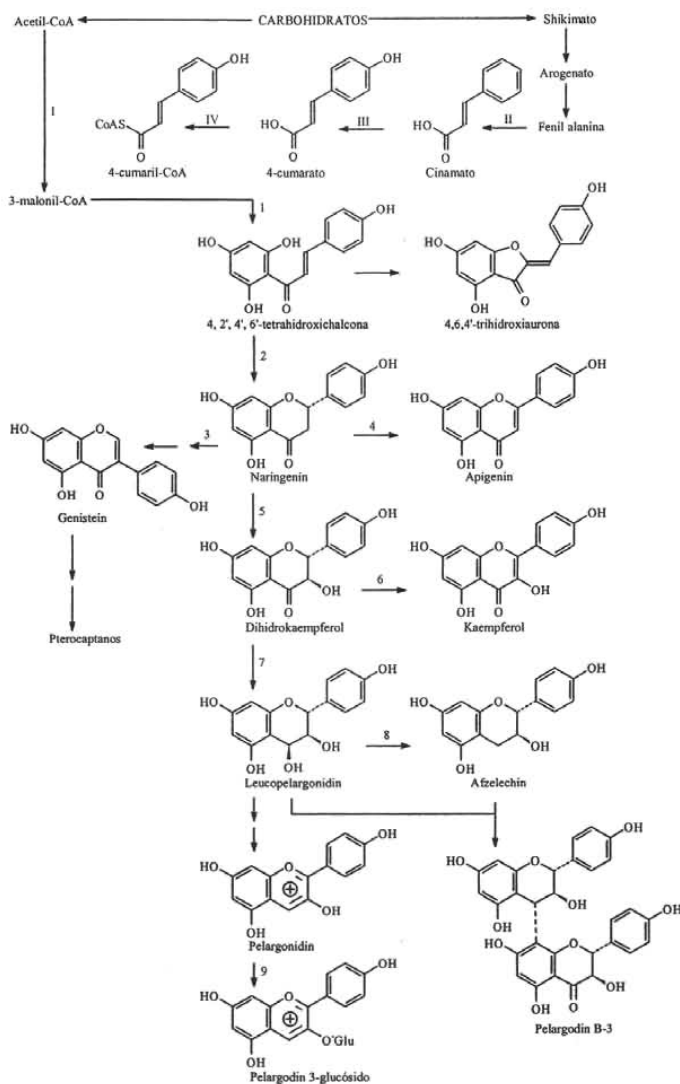


Fig. 13. Esquema de las rutas biosintéticas de la fenilalanina y acetil-CoA. Las enzimas requeridas en la obtención de pre-flavonoides son marcados en números romanos y la de la ruta de flavonoides en números arábigos.

Botta y colaboradores⁵⁵ han descrito el aislamiento de una peroxidasa ácida (EC 1.11.1.7) de *S. didymobotrya* (Sena silvestre). Esta enzima es una glicoproteína con un pl

de 3.5, un peso molecular aproximado de 43 kDa por SDS/PAGE y 50 kDa por filtración en gel. La peroxidasa presentó una alta especificidad hacia compuestos fenólicos naturales como el alcohol coniferil, el guayacol, el ác. ferúlico y el cafeico. Sin embargo, la enzima fue capaz de catalizar la oxidación de 4,2',4'-trihidroxichalcona (Fig. 14; 17), en la 3,3'-biflavanona (Fig. 14; 18).⁵⁶

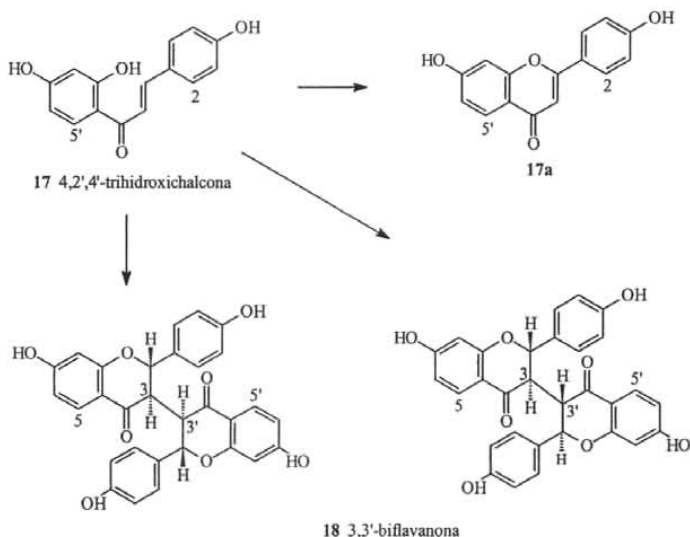


Figura 14. Dimeros obtenidos de la reacción de la 4,2',4'-trihidroxichalcona con la peroxidasa ácida aislada de *S. didymobotrya*

1.3. PEROXIDASAS Y POLIFENOL OXIDASAS

Las polifenol oxidasas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Estas enzimas son conocidas por catalizar la oxidación en los fenoles y se dividen en dos clases importantes: i) las tirosinasas (o-difenol oxidasas), ii) las lacasas (p-difenol oxidasas). Aunque no son propiamente polifenol oxidasas, las peroxidadas son un grupo de enzimas oxidantes de compuestos fenólicos. Esta última dependiente del H₂O₂, mientras que las dos primeras no requieren de este compuesto.⁵⁵

1.3.1. PEROXIDASAS

Las peroxidadas son enzimas distribuidas ampliamente entre las plantas. Se localizan principalmente en las vacuolas, tonoplastos, plasmalema y dentro y fuera de la pared celular. Están involucradas en la regulación hormonal, en los mecanismos de defensa, en el control de la elongación celular, en la polimerización y la biosíntesis de lignina y en los procesos de suberización.⁵⁶

Las peroxidadas de las plantas forman un grupo único de isoenzimas, aparentemente presentes en todas las células. Estas enzimas pueden existir bajo diferentes formas redox

in vitro. La posible implicación biológica de esta multiplicidad de estados no ha sido estudiada *in vivo*. Sabemos que algunas de las reacciones de las peroxididasas que han sido observadas *in vitro*, ocurren *in vivo*, otras son inciertas. Es el caso de la formación de los compuestos diméricos de antraquinonas, demostrar que la peroxidasa de la planta lleva a cabo la reacción de acoplamiento oxidativo fenólico con antraquinonas, nos daría una idea de lo que ocurre *in vivo*, demostrando que estos dímeros son producto de una ruta biogénica en donde están implicadas las peroxididasas.

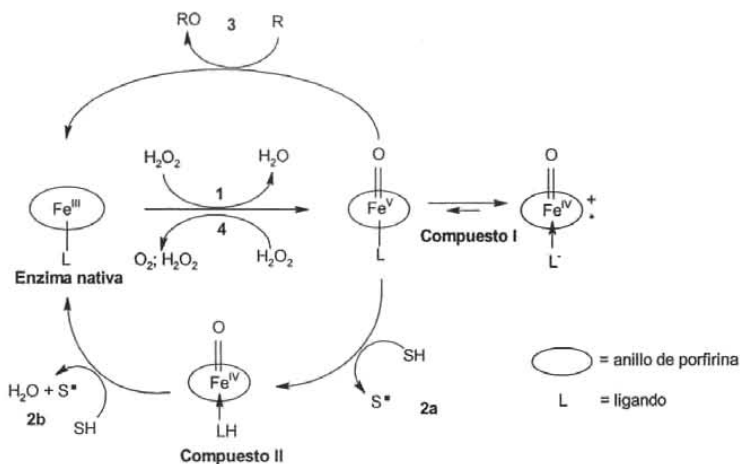


Fig. 15. Ciclo de reacción de las peroxididasas

Las peroxididasas contienen el grupo hemo como grupo prostético (hierro III protoporfirina IX), aunque algunas peroxididasas tienen diferentes centros catalíticos (*vide infra*). Durante la catálisis, los hemos de las peroxididasas son oxidados por el peróxido a una especie oxo (hierro V) la cual se presenta predominantemente como una especie catión radical hierro IV oxo porfirina (Fig. 15). Esta especie se denomina compuesto I. A cambio de un oxígeno molecular y de un cosubstrato, el cual transfiere 2 átomos de hidrógeno, las peroxididasas pueden formar directamente especies de hierro V de la enzima nativa y del peróxido de hidrógeno (ruta 1 en la fig. 15). El compuesto I puede ser reducido a la enzima nativa por varios mecanismos dependiendo del tipo de reacción.

De acuerdo al tipo de reacción, las peroxididasas pueden dividirse en las siguientes cuatro categorías:

1. Des-hidrogenación oxidativa (reacción clásica de las peroxididasas, ruta 2a y 2b en la fig. 15)



2. Halogenación oxidativa (ruta 3 en la fig. 15)



3. Reacción de catalasas (ruta 4 en la fig. 15)



4. Reacciones de transferencias de oxígeno (ruta 3 en la fig. 15; R= substrato orgánico)



1.3.1.1. DIVERSIDAD Y CONSERVACION DE LAS PEROXIDASAS DE LAS PLANTAS

Las plantas tienen un gran número de isoenzimas de peroxidasas, como se demuestra en los ensayos de actividad de las peroxidasas aisladas.⁵⁷ Sus características isoenzimáticas reflejan la diversidad genética, las modificaciones postraduccionales, las condiciones fisiológicas y los artificios de extracción. Además, esta diversidad aumenta con las variaciones interespecies. Con la tecnología genética en el estudio de las peroxidasas, las bases moleculares de la diversidad de peroxidasas está en camino de ser elucidada.

1.3.1.2. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LAS PEROXIDASAS

Las peroxidasas están ampliamente distribuidas en las plantas,⁵⁸ son responsables de la biosíntesis de los polímeros de la pared celular,⁵⁹ de algunos mecanismos de defensa,^{60,61,62} del control de la elongación celular, de la biosíntesis de lignina,⁶³ entre otros.

Este tipo de enzimas se ha identificado en las plantas superiores. Se distinguen dos principales grupos de peroxidasas, las ácidas y las básicas, con un intervalo de *pI* de entre 3.5 a 9.5 aproximadamente.⁶⁴

No se conoce el papel preciso de las isoformas y falta información sobre la localización de las enzimas y sus substratos *in vivo*.⁶⁵

Como se espera para la biosíntesis de la lignina, algunas peroxidasas se localizan principalmente en la pared celular. También se han descrito otras localizaciones subcelulares, por ejemplo en la vacuola. Morales *et al*, realizaron estudios sobre la localización de las isoenzimas de *Lupinus albus* (Fabaceae), *Vitis vinifera* (Vitaceae), *Capsicum annuum* (Solanaceae), *Lactuca sativa* (Asteraceae) y *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), y encontraron que, en todas las plantas estudiadas, la pared celular contenía el grupo completo de isoenzimas de peroxidasas, incluyendo las isoenzimas básicas (*pI*>7.0) y las ácidas (*pI*<7.0). En cambio en las vacuolas solamente encontraron un grupo de isoenzimas básicas de un *pI* más alto (*pI*>9.2).⁵⁵

La mayor parte de los estudios se ha realizado en plantas silvestres. En fechas recientes se han utilizado también cultivos de tejidos vegetales lo cual ofrece la posibilidad de investigar la función y especificidad de estas enzimas.

En los últimos años se han publicado diversos estudios sobre el aislamiento y la caracterización de las peroxidasas, generalmente utilizando un esquema de trabajo parecido.

Pomar *et al.*⁶⁵ describe el aislamiento, la caracterización y las propiedades cinéticas de la peroxidasa ácida de *Capsicum annum L.* Para determinar su localización, realizó un fraccionamiento subcelular de los frutos de esta planta. El procedimiento de la purificación se resume en la siguiente tabla 2.

Tabla 2: Purificación de la peroxidasa ácida de *Capsicum annum l.*

Pasos	Actividad (unidades)	total	Proteína total (mg)	Actividad específica (u/ mg)	Rendimiento
Extracto crudo	227		111	2.04	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	193		42	4.53	85.0
Sephadex G-100	83.5		7.4	11.3	36.7
Q-Sepharosa	25.4		0.21	123	11.2
Superosa 12 PC 3.2/3.0	2.8		0.005	608	1.2

Como se observa en la tabla anterior, el paso importante en la purificación de la enzima, se realizó con la elución cromatográfica con Q-sepharosa.

1.3.3. ENSAYOS ENZIMATICOS

Durante el proceso de purificación, la actividad de la enzima se mide a través de la oxidación del guayacol por su absorbancia a 470 nm.

Una unidad se define como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μ mol de guayacol por minuto por mililitro de la preparación enzimática a 470 nm ($\epsilon_{470} = 26.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

La actividad de la enzima se puede determinar por la disminución en la máximos de absorción del ácido ascorbico (290 nm), del NADH (340 nm), del alcohol coniferil (262 nm), del ácido ferúlico y de la vainillina (310 nm) y del ácido cafeico y cumárico (285 nm). Todos los sustratos deben tener una concentración final de 0.3 nM.

1.3.3.1. ANALISIS CINETICO

De acuerdo al análisis cinético de las peroxidasas, se ha aceptado el siguiente mecanismo de reacción:^{66,67,68}



P = Peroxidasa, Co I = Compuesto I, Co II = Compuesto II, AH = Sustrato reducido, A[·] = Radical del sustrato.

Condiciones de equilibrio:

$$d[P]/dt = k_3 [CoII][AH] - k_1 [P][H_2O_2] = 0 \quad (4)$$

$$d[CoI]/dt = k_1 [P][H_2O_2] - k_2 [CoI][AH] = 0 \quad (5)$$

$$d[CoII]/dt = k_2 [CoI][AH] - k_3 [CoII][AH] = 0 \quad (6)$$

Balance de Masas:

$$[E]_0 = [P] + [CoI] + [CoII] \quad (7)$$

$$[E]_0 = \{(k_3[AH]/k_1[H_2O_2]) + k_3/k_2 + 1\}[CoII] \quad (8)$$

Expresión de la velocidad Inicial:

$$-d[AH]/dt = k_2[CoI][AH] + k_3[CoII][AH] \quad (9)$$

1.3.2. LACASAS

Las lacasas (polifenol oxidasa. Ec. 1.10.3.2.) son enzimas que contienen cobre en su estructura el cual cataliza la oxidación de una gran variedad de compuestos orgánicos acoplados a la reducción molecular del oxígeno en agua. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en las plantas superiores y en los hongos. En tejidos leñosos las lacasas están relacionadas con la síntesis de lignina, mientras que en los hongos se relacionan con la degradación de la lignina. Muchas enzimas son extracelulares, aunque se han encontrado lacasas intracelulares como en el caso de *Glomerella*. La función de la lacasa de los hongos está asociada con la degradación de la lignina. Esta actividad degradativa está relacionada con la habilidad de la lacasa para afectar el grado de polimerización del sustrato. Las lacasas pueden oxidar, desmetilar, polimerizar o despolimerizar. Por ello se cuestiona que la importancia no es precisamente la oxidación de la lignina *per se*.^{56,69,70}

1.3.2.2. LACASAS INVOLUCRADAS EN EL PROCESO DE LIGNIFICACION

Se supone, mas no se ha comprobado, que las lacasas en las plantas son constitutivas. Sin embargo, nunca se han seguido los cambios a nivel enzimático durante el desarrollo. Cuando las lacasas se relacionan con los procesos de lignificación, se han localizado cerca de la pared celular de las células lignificantes. La lignina se forma vía la polimerización oxidativa de los monolignoles dentro de la matriz de la pared celular. Las peroxidases, las cuales son más abundantes dentro de la pared celular, son las principales catalizadoras de esta reacción. Sin embargo, las evidencias recientes indican que las lacasas secretadas en las paredes secundarias de los tejidos vasculares son capaces de polimerizar monolignoles en presencia del oxígeno.⁷¹ La posibilidad de que las lacasas estén involucradas en los procesos de lignificación fue propuesta desde 1958 por Freudenberg. Recientes estudios hechos por Sterjiades et al demostraron que la lacasa de *Acer pseudoplatanus* es capaz de polimerizar monolignoles en ausencia de las peroxidases. Este grupo sugiere, sin embargo, que las lacasas están involucradas solo en

los procesos iniciales de la lignificación, mientras que las peroxidasas están involucradas en los posteriores.^{72,73}

Debido a que la lignina es uno de los polímeros fenólicos más recalcitrantes en la tierra, las enzimas ligninolíticas se utilizan en los procesos de limpieza de los compuestos aromáticos que contaminan el medio ambiente. Además, en presencia de algunos mediadores, las lacasas son capaces de oxidar compuestos no fenólicos y algunos que no son sustratos de estas enzimas.⁷⁴ La oxidación de compuestos de lignina no fenólicos y de compuestos aromáticos policíclicos usando el sistema mediado por lacasa, han sido reportados.^{75,76,77,78,79,80}

1.3.3.3. ACOPLAMIENTO OXIDATIVO FENOLICO DE LAS LACASAS POR MEDIO DE MEDIADORES

Los estudios sobre el mecanismo de reacción de las polifenol oxidasas se han enfocado en el enlace dinuclear del cobre, el cual está presente en las proteínas con cobre "Tipo III" a las que pertenecen las lacasas. Estas proteínas están caracterizadas por poseer dos iones de cobre antiferromagnéticamente acoplados cerca del sitio activo, capaces de enlazar una molécula de oxígeno para formar un complejo di-oxígeno-di-cobre II, como se muestra en el siguiente esquema.^{81,82,83}

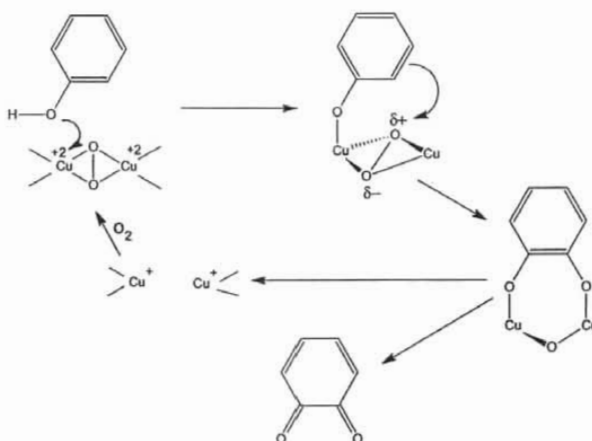


Figura 16. Mecanismo de reacción de las lacasas.

El mecanismo de reacción de las lacasas involucra la extracción de un protón (H) para formar el respectivo radical fenoxi el cual puede sufrir una oxidación enzimática para dar estructuras tipo quinona o participar en reacciones no enzimáticas como la deshidratación y/o la polimerización.^{84,85,86}

Reportes recientes han demostrado el uso eficiente de algunos compuestos que pueden "mediar" la oxidación de compuestos no-fenólicos y de los compuestos que no son sustratos propios de las lacasas.^{74,87,88} Algunos estudios reportan la concordancia de estos compuestos con la actividad catalítica de algunos metabolitos secundarios

presentes en plantas, bajo condiciones similares.^{89,90} El papel de estos mediadores en la reacción catalítica de las peroxidasas se muestran en la figura 17.

Un mediador es una pequeña molécula que actúa como un "iniciador electrónico": una vez que es oxidado por la enzima, se difunde fuera del sitio activo e inicia el proceso de oxidación en otra molécula que, por su tamaño, no es accesible al sitio activo de la enzima. El mediador oxidado puede iniciar un mecanismo de oxidación que no se podría llevar a cabo en la enzima.

Como un ejemplo, el alcohol veratrílico aparece como un mediador propio de la actividad de la lignina peroxidasa en el hongo *Phanerochaete chrysosporium*,⁸⁹ mientras que el ácido 3-hidroxiantranílico se reporta como mediador de la actividad de lacasa en el hongo *Pycnoporus cinnabarinus* en la degradación de estructuras de lignina no-fenólicas.⁹⁰

Se han reportado diversos mediadores, siendo los más usados el ABTS (ácido 2,2'-azino bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), el HAA (ácido 3-hidroxiantranílico), el HBT (1-hidroxibenzotriazol), el DPPH (2,2'-difenil-1-picrilhidrazol).⁹¹

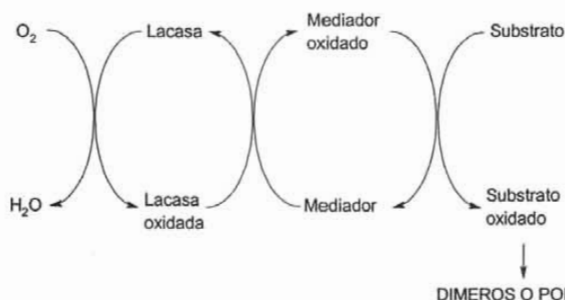


Figura 17: Mecanismo de reacción en el sistema mediado por lacasas

La variedad en las funciones que realizan las peroxidasas y las lacasas se evidencia por la presencia de diversas isoenzimas. Sin embargo, se desconoce el papel que tiene cada una de las isoformas debido a la falta de información sobre la localización delular de las enzimas y la disponibilidad de sus sustratos.

En las especies de *Senna* la enzimología de los últimos pasos en el metabolismo de las biantraquinonas y los biflavonoides permanece incompleta, a pesar de que estos compuestos presentan características del acoplamiento oxidativo fenólico.

1.4. ACOPLAMIENTO OXIDATIVO FENOLICO

La formación de enlaces $C_{aromático}-C_{aromático}$, se encuentra clasificada dentro de la síntesis química de las reacciones de acoplamiento oxidativo fenólico. Este tipo de reacciones corresponde a un grupo de reacciones de oxidación clásicas las cuales involucran radicales. En estas reacciones, la transferencia de electrones de una sal metálica a un bis-fenol permite un acoplamiento intramolecular y un producto tipo quinona. Sin embargo, a pesar de que en años recientes se han realizado muchos esfuerzos por mejorar y desarrollar nuevos métodos sintéticos de acoplamiento oxidativo fenólico, las condiciones drásticas usadas en los procedimientos requieren de varias protecciones y

desprotecciones de los grupos sensibles presentes en las moléculas iniciales y solo se obtienen rendimientos modestos de los productos deseados.⁹² Se presenta a continuación una agrupación de los métodos actuales que se han usado para las arilaciones aromáticas:

- I. Reacción de Ullman^{93,94,95,96,97,98}
- II. Reacción de Scholl⁹⁹
- III. Acoplamiento mediante radicales¹⁰⁰
- IV. Acoplamiento mediante benzinos¹⁰¹
- V. Acoplamientos homoaril-litio y homo Grignard¹⁰²
- VI. Aril yoduros y diaril cupratos de litio^{103,104}

Estas técnicas presentan varios problemas, incluyendo algunas limitaciones primarias para la preparación de los bifenilos simétricos (I, II y V), pérdida de regioselectividad con respecto a ambos reactantes resultantes de la mezcla de productos isoméricos (II, III, y IV), así como condiciones de reacciones severas y muy bajos rendimientos.¹⁰⁵

Muchos productos, incluyendo alcaloides, flavonoides, péptidos cíclicos, antibióticos glicopéptidos y algunas otras moléculas complejas, presentan enlaces C-C ó C-O, característicos de un acoplamiento fenólico. Las enzimas oxidativas como las peroxidasas y las lacasas, las cuales catalizan este tipo de reacción, pueden constituir una alternativa tecnológica para la obtención de estos productos, especialmente cuando los sustratos contienen grupos sensibles a las oxidaciones.

JUSTIFICACION

La presencia de peroxidasas y/o "polifenol oxidasas" en los cultivos vegetales de *Senna* parece estar involucrada en la dimerización de algunas antraquinonas y flavonoides. D

El demostrar qué tipos de enzimas están involucradas en la formación de las biantraquinonas y los biflavonoides, nos permitirá elucidar el último paso en la ruta biogénética de estos compuestos. Al demostrar la participación de enzimas en este paso se podría desechar la hipótesis de que estos compuestos se forman como un artefacto del proceso de extracción fitoquímica.

Debido a la importancia descrita de estos dímeros como agentes antivirales, se requiere buscar y/o desarrollar métodos alternativos para su síntesis.

El interés en las transformaciones oxidativas biocatalizadas ha aumentado en los últimos años por dos situaciones principales: la necesidad de reemplazar los métodos de oxidación, que utilizan sales de metales pesados por el peróxido de hidrógeno u oxígeno como oxidantes y la necesidad de incrementar la selectividad en las reacciones químicas para mejorar los rendimientos, minimizar los desechos de reacción y evitar problemas enantioméricos.

Las peroxidasas constituyen una buena alternativa para lograr un proceso de acoplamiento oxidativo en un sistema polifenoles. Este estudio propone un método alternativo para este tipo de reacciones.

El estudiar los parámetros cinéticos de las peroxidasas involucradas en los procesos de acoplamiento oxidativo de las antraquinonas y los flavonoides nos ayudará también a tener una idea más clara de los procesos catalíticos de estas enzimas con estos sustratos. Estos estudios permitirán que se puedan iniciar otros estudios para el mejor uso de estos biocatalizadores.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar la participación de las peroxidasas en la dimerización de las 9,10-antraquinonas para producir biantraquinonas.

Demostrar la participación de las peroxidasas en la dimerización del flavonoide quercetina para producir el dímero de quercetina.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar qué tipo de peroxidasa está involucrada en la catálisis de las biantraquinonas a partir de las 9,10-antraquinonas

Determinar la estructura química de los compuestos que se forman en el acoplamiento oxidativo de las 9,10-antraquinonas con las peroxidasas

Determinar la participación de las peroxidasas en la catálisis de la quercetina en dímero de quercetina

Determinar la estructura química de los compuestos que se forman en el acoplamiento oxidativo de la quercetina con las peroxidasas

Determinar los parámetros cinéticos de las diferentes reacciones.

Demostrar la formación de dímeros de antraquinona en los extractos de *Senna sp.*

2. MATERIAL Y METODOS

2. MATERIAL Y METODOS

AGENTES QUIMICOS: rheina (255 nm), emodina, alizarina (250 nm), quinizarina (250 nm), 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic acid (ABTS) obtenidos de Sigma.

ENZIMAS: Manganese peroxidasa, cloroperoxidasa, lignina peroxidasa, peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidase; HRP). Lacasa de *Coriopsis gallicans*,⁶⁹ peroxidasa de *Senna angustifolia*.

ENSAYOS ENZIMATICOS^{67,68}

La actividad de cada una de las peroxidases fue monitoreada en HPLC a la longitud de onda de cada uno de los sustratos, midiendo la disminución del pico del sustrato. La mezcla de reacción fue eluida con una mezcla de buffer de acetatos 100 mM (pH 3):THF (50:50 v/v)

MANGANESO PEROXIDASA: La reacción se llevó a cabo a 25°C en 1.5 ml de mezcla de reacción la cual contenía 850 µL de solución amortiguadora de succinatos 20 mM (pH 4.5), 100 µL MnSO₄ 100 mM, 50 µL H₂O₂ de 1 mM, 4 µL sustrato 4 mM y 50 µL de manganese peroxidasa.

CLORO PEROXIDASA: La reacción se llevó a cabo a 25°C en 1.0 ml de mezcla de reacción la cual contenía 850 µL solución amortiguadora de acetatos 60 mM (pH 3), 100 µL de KCl 20 mM, 5 µL H₂O₂ de 1 mM, 5 µL de sustrato 4 mM y 10 µL de cloro peroxidasa.

LIGNINA PEROXIDASA: La reacción se llevó a cabo a 25°C en 1.5 ml de mezcla de reacción la cual contenía 1 mL solución amortiguadora de succinatos 40 mM (pH 4.0), 5 µL de H₂O₂ 1 mM, 10 µL de sustrato 4 mM y lignina peroxidasa.

HORSERADISH PEROXIDASA: La reacción se llevó a cabo a 25°C en 1.3 ml de mezcla de reacción la cual contenía 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos 60 mM (pH 6.1), 5 µL de H₂O₂ (1 mM), 5 µL de sustrato (Antraquinona; 4 mM) y 20 µL de la enzima Horseradish peroxidasa (1/100 en solución amortiguadora de fosfatos, 7.8 µg de proteína).

LACASA: La reacción se llevó a cabo a 25°C en 1.5 ml de mezcla de reacción la cual contenía solución amortiguadora de acetatos 100 mM (pH 4.5), ABTS 1 mM, sustrato 4 mM y Lacasa.

ENSAYO CON EXTRACTO DE *Senna angustifolia*: La reacción fue realizada a 25°C en 1.5 ml de mezcla de reacción la cual contenía solución amortiguadora de fosfatos 60 mM (pH 6.1), guayacol 160 mM, H₂O₂ 200 mM y extracto acuoso de *Senna angustifolia*.

Para obtener suficiente producto para su análisis respectivo se realizó una mezcla de reacción de 50 ml que contenía las concentraciones de los respectivos ensayos enzimáticos.

PURIFICACION DE LA PEROXIDASA DE *Senna angustifolia*.

MATERIAL: *S. angustifolia* fue colectada en las inmediaciones de Ciudad Universitaria (UNAM). Todos los pasos descritos a continuación se realizaron a 4°C.

PREPARACION DEL EXTRACTO DE *Senna angustifolia*: 500 gr. de hojas frescas de *S. angustifolia* fueron homogeneizadas en buffer de fosfatos (60mM), pH 6.1. Se filtró el homogenizado a través de una gasa para remover los residuos de las hojas. El extracto se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min. Se concentró por medio de ultrafiltración (Amicon, membrana de 10,000 daltons).

TRATAMIENTO CON SULFATO DE AMONIO: Al sobrenadante colectado (180 mL) se le realizaron dos tratamientos con sulfato de amonio. Se le adicionaron 43.74 gr (40%), la mezcla se agito durante 20 min, se centrifugó y colectó el sobrenadante. A este se le adicionaron 100.98 gr de sulfato de amonio (80%), se dejo en agitación durante 20 minutos y después la mezcla se centrifugó. El sobrenadante se desecho y el paquete obtenido se resuspendio en buffer de fosfatos para una posterior diálisis en amortiguador de fosfatos.

COLUMNA CROMATOGRAFICA DE INTERCAMBIO IONICO: Con la solución dializada se realizó una separación cromatográfica de intercambio iónico en Celulosa DE52 (Whatman), equilibrada con buffer de fosfatos 10 mM, pH 6, y eluida con un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. Las fracciones incoloras con mayor actividad de peroxidasa fueron colectadas y concentradas en ultrafiltración (Amicon).

Las fracciones colectadas se purificaron por medio de columnas High Q (strong anionic interaction) and High S (strong cationic interaction).

La pureza de la preparacion enzimática se analizó por electroforesis en SDS-PAGE, utilizando 8% de gel de acrilamida y una mezcla de miosina (212 000), MBP-b-galactosidasa (158 194), b-galactosidasa (116 351), fosforilasa b (97 184), BSA (66 409), glutamico deshidrogenasa (55 561), MBM2 (42 710), lactato deshidrogenasa (36 487), fueron utilizadas como estandares de peso molecular.

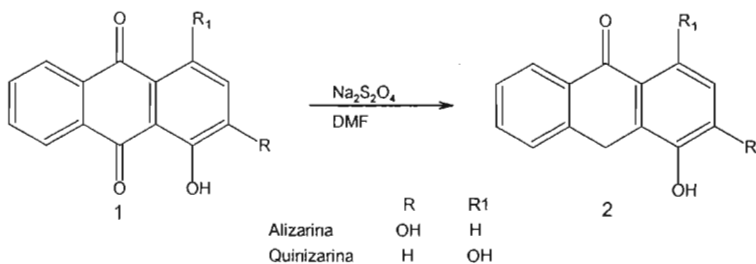
ENSAYO DE PROTEINAS (BIO-RAD). 1) Preparar el colorante diluyendo 1 parte del colorante concentrado por 4 partes de agua destilada y deionizada. Filtrar con un filtro Whatman #1 para eliminar las particulas. 2) Preparar de tres a cinco diluciones de una proteina estándar, la cual es representativa de la solución de pteínas que serán probadas. El rango lineal del ensayo para BSA es de 0.2 a 0.9 mg/ml, mientras que para IgG el rango lineal es de 0.2 a 1.5 mg/ml. 3) Agregar 100 mg de cada solución estandar y de muestra en un tubo limpio y seco. El ensayo se debe hacer generalmente por triplicado. 4) Incubar a temperatura ambiente por lo menos 5 minutos. La absorbancia incrementa con el tiempo; las muestras pueden ser incubadas a temperatura ambiente hasta por 1 hora. 6) Medir la absorbancia a 595 nm.

PURIFICACION DE ALIZARINA Y PURPURINA.

2 gr. de la antraquinona se purificaron en una columna cromatográfica con diclorometano. Las fracciones colectadas correspondientes al compuesto, fueron concentradas y disueltas nuevamente en el solvente. La solución de diclorometano se dejo evaporar y se obtuvieron cristales correspondientes a la respectiva antraquinona (1.5 gr, 99% de pureza).

SINTESIS DE ANTRACENONAS¹⁰⁶

Reducción con ditionato de sodio de antracendionas peri-sustituadas.- A una suspensión de la antracendiona correspondiente (1, 2.0 g, 5.76-8.96 mmol) en DMF (100 mL) y agua (100 mL) se le agrega $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (14.0 g, 80.41 mmol). La solución se calentó lentamente a 90 °C en un período de 30 minutos en N_2 . La mezcla se mantuvo en agitación hasta que la reacción fue completa (monitoreo por CCF, $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 9:1). La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se le agregó agua (1L), se extrajo con CH_2Cl_2 (4X100 mL). La fase orgánica fue lavada con agua (4X200 mL), secada con Na_2SO_4 , evaporada y purificada por columna cromatográfica, para dar la correspondiente antracenona (2).

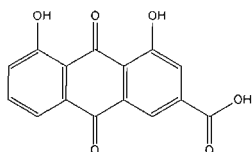


3. RESULTADOS

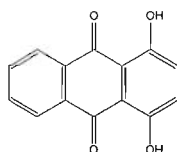
3. RESULTADOS

Para el presente proyecto fueron utilizados 9 compuestos fenólicos con las siguientes características:

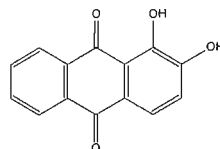
- 6 ANTRAQUINONAS: rehina (1), quinizarina (2), alizarina (3), purpurina (4), emodina (5) y aloe-emodina (6)



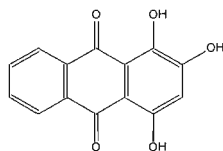
1 Rheina



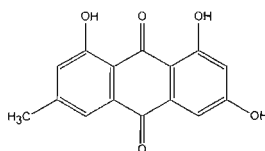
2 Quinizarina



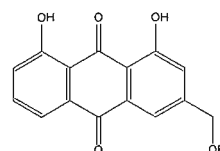
3 Alizarina



4 Purpurina

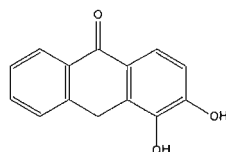


5 Emodina

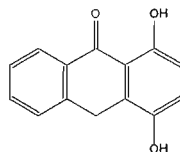


6 Aloe-emodina

- 2 ANTRACENONAS: alizarin-antracena (7) y purpurin-antracena (8).

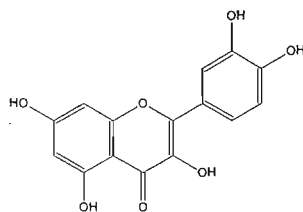


7 Alizarin-antracena



8 Quinizarin-antracena

- 1 FLAVONOIDE: quercetina (9)



9 Quercetina

los cuales fueron ensayados con las siguientes enzimas:

- MANGANESO PEROXIDASA
- CLOROPEROXIDASA
- LIGNINA PEROXIDASA
- LACASA DE *Coriopsis gallicans*.
- PEROXIDASA de rábano picante (horseradish peroxidase; HRP)
- PEROXIDASA de *Senna angustifolia*. (PSA)

Se ensayaron cada uno de los compuestos con las respectivas enzimas y la actividad de estas fue monitoreada en HPLC, a la longitud de onda máxima y midiendo la disminución del pico de cada sustrato. Como mezcla eluyente se utilizó buffer de acetatos 100 mM (pH 3)-THF (50:50 v/v), con un flujo de 1 ml/min.

Los resultados se observan en la Tabla 3 y 4. Los diferentes ensayos se realizaron por triplicado y para aquellos que presentaron actividad se realizaron dos veces.

TABLA 3: Ensayos de las Antraquinonas 1-6 con las PEROXIDASAS Y la LACASA.

	Rheina (1)	Quinizarina (2)	Alizarina (3)	Purpurina (4)	Emodina (5)	Aloe-emodina (6)
Manganeso peroxidasa	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Cloroperoxidasa	NR	NR	40 %	-	-	NR
HRP	NR	10%	98 %	97%	10%	NR
Lignina peroxidasa	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Lacasa de <i>C. gallicans</i> .	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Lacasa de <i>C. gallicans</i> + ABTS	98 %	100 %	100 %	100%	100%	100%
Peroxidasa de <i>S. angustifolia</i>	NR	NR	90%	85%	5%	NR

NR: No hay reacción, %: porcentaje de la reacción

TABLA 4: Ensayos de las Antracenas 7-8 y el flavonoide Quercetina 9 con la peroxidasa de rábano picante (HRP) y la peroxidasa de *Senna angustifolia* (PSA).

	Alizarin-antracena (7)	Quinizarin-antracena (8)	Quercetina (9)
HRP	100%	80%	100 %
Peroxidasa de <i>S. angustifolia</i>	100%	74%	100%

De estos resultados se estudiaron las reacciones de cada sustrato con la enzima que presento mayor bioconversión y que a continuación se detalla.

3.1. ACOPLAMIENTO OXIDATIVO FENOLICO DE LAS ANTRAQUINONAS CON LA LACASA

Los sustratos fueron ensayados con la lacasas de *Coriopsis gallicans*. Cada reacción fue realizada a 25°C en 1.5 ml de mezcla de reacción la cual contenía buffer de acetatos 100 mM (pH 4.5), ABTS 1 mM, sustrato 4 mM y Lacasa.

TABLA 5: Ensayos de las Antraquinonas 1-6 con lacasa de *C. gallicans*.

	Rheina (1)	Quinizarina (2)	Alizarina (3)	Purpurina (4)	Emodina (5)	Aloe-emodina (6)
Lacasa	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Lacasa + ABTS	98 %	100 %	100 %	100%	100%	100%

NR: No hay reacción.

La enzima lacasa presenta reacción sólo en presencia de un mediador de radicales (ABTS) (Tabla 5). Bajo estas condiciones la enzima lacasa fue la que mayor actividad presentó con la mayoría de los sustratos ensayados. Aloe-emodina, emodina, purpurina, quinizarina y alizarina presentan disminución del pico base en un 100 % con la enzima, mientras que rheina lo hizo en un 98 %. El ensayo se realizó utilizando una enzima concentrada a temperatura ambiente con un tiempo de reacción de aproximadamente 15 horas y como se observa en los cromatogramas de las reacciones, presentan la formación de mas de un producto (Figuras 18 y 19; cromatogramas 1 y 2).

Los siguientes blancos fueron utilizados para la reacción de los sustratos antraquinoides con lacasa: 1) lacasa + ABTS y 2) ABTS + sustrato. En ningún ensayo se observó la aparición de un producto que correspondiera a los picos de productos observados en la reacción completa.

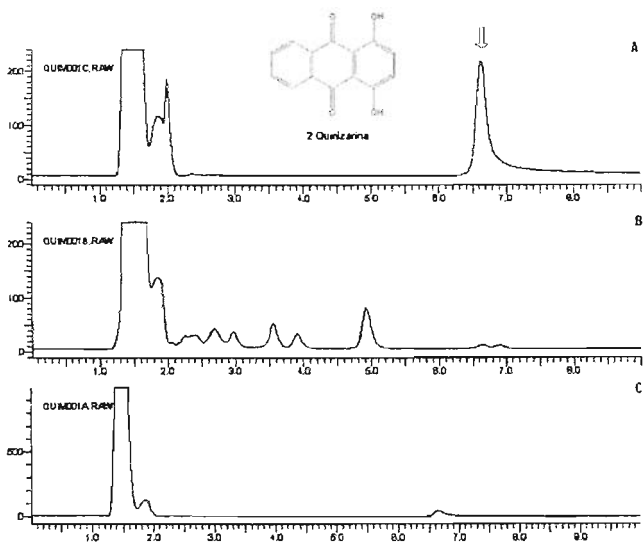


Figura 18. Cromatogramas de la reacción de la lacasa con la quinizarina (tr 6.6 min). A) En presencia de ABTS, tiempo cero. B) En presencia de ABTS, 15 horas de reacción. C) Blanco de lacasa con ABTS.

El estudio de los productos se realizó en 50 mL de reacción, a temperatura ambiente en un tiempo aproximado de 15 horas. Se realizaron ensayos con quinizarina y alizarina, en ambos casos se obtuvo un 100 % de reacción. Los productos obtenidos se separaron a

través de una HPLC, para obtener aproximadamente 8 fracciones para cada antraquinona.

Sin embargo las cantidades obtenidas bajo estas condiciones fue muy reducido, imposibilitando el respectivo análisis de resonancia magnética nuclear para determinar la estructura de los compuestos obtenidos.

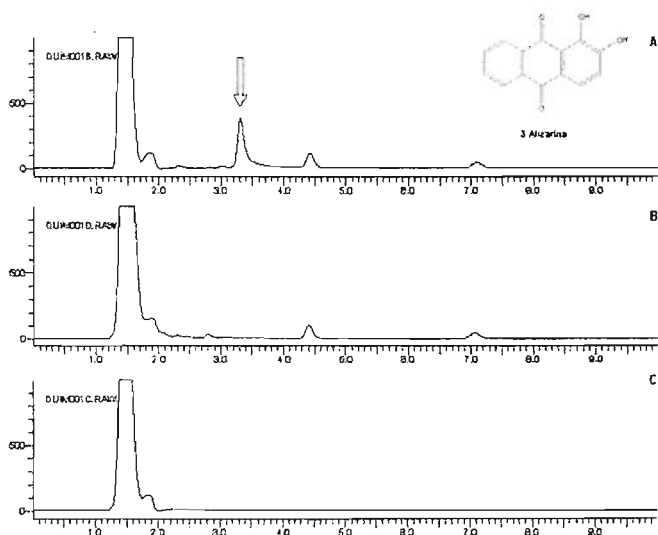


Figura 19. Cromatogramas de la reacción de la lacasa con la alizarina (tr 3.3 min). A) En presencia de ABTS, tiempo cero. B) En presencia de ABTS, 15 horas de reacción. C) Blanco de lacasa con ABTS.

3.1.1. ANALISIS DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS EN LA OXIDACION CON LA LACASA.

Para determinar la naturaleza química de los compuestos obtenidos en la reacción de la lacasa con las antraquinonas alizarina y quinizarina, la mezcla de productos obtenidos en la extracción con AcOEt fueron separados en una columna preparativa en HPLC con una mezcla de elución THF:Solución reguladora de Acetatos (pH 3) (50:50 v/v).

3.1.1.1. ALIZARINA

Los productos se separaron por HPLC y se detectaron a 250 nm en la mezcla de reacción de la antraquinona alizarina con la lacasa y ABTS (Cromatogramas 1 y 2 de Alizarina).

Los espectros de masas correspondientes a las fracciones 2 y 4 presentan la siguiente fragmentación (ver espectros de masa de Alizarina):

Fracción 1: El m/z (rel. int.): 508 [M]⁺, 480 [M-29]⁺, 452 [M-CO-29]⁺, 368, 340, 256 [M-255]⁺.

Fracción 2: FAB⁺-MS *m/z* (rel. int.): 592 [M]⁺, 564 [M-29]⁺, 536 [M-CO-29]⁺, 508, 480, 452, 424, 340, 256 [M-255]⁺.

3.1.1.2. QUINIZARINA

Los productos fueron detectados y separados por HPLC a 250 nm de la mezcla de reacción de la antraquinona alizarina con lacasa y ABTS (Cromatogramas 1 y 2 de quinizarina).

Los espectros de masas correspondientes a las fracciones 4 y 5 presentan la siguiente fragmentación (ver espectros de masa de quinizarina):

Fracción 4: El *m/z* (rel. int.): 289 [M]⁺, 240 [Q]⁺.

Fracción 5: El *m/z* (rel. int.): 508 [M]⁺, 480 [M-29]⁺, 452 [M-CO-29]⁺, 368, 340, 256 [M-255]⁺.

No se obtuvo suficiente muestra para el análisis de RMN-¹H ó ¹³C.

3.2. ACOPLAMIENTO OXIDATIVO DE LAS ANTRAQUINONAS CON LAS PEROXIDASAS

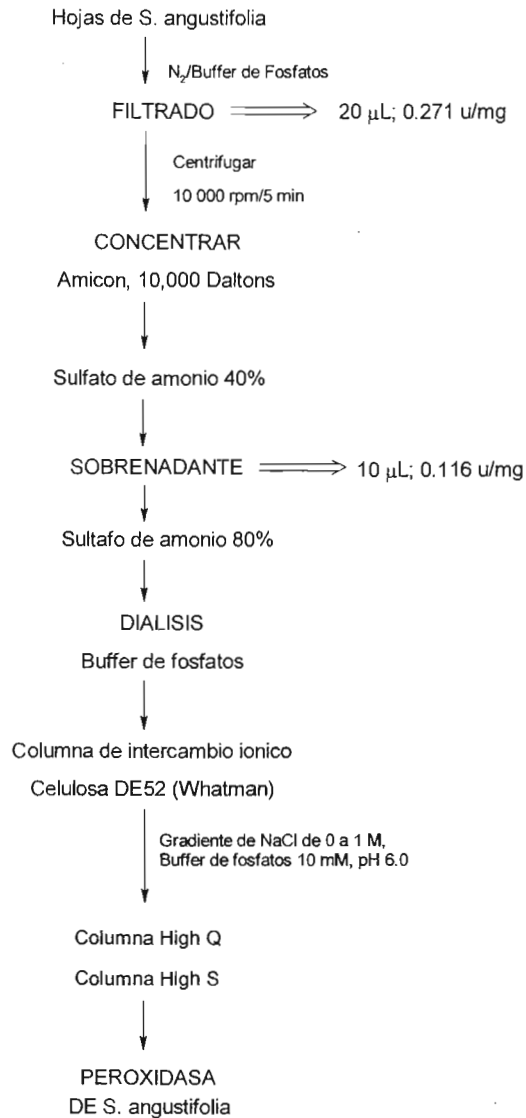
3.2.1. OBTENCION DE LA PEROXIDASA DE *Senna angustifolia*

Para demostrar la capacidad de acoplamiento oxidativo fenólico mediado por peroxidasas, se purificó un extracto de la enzima peroxidasa en la especie *Senna angustifolia*.

Debido a que el género *Senna* es uno de los mas estudiados por la obtención de dímeros de antraquinonas y de flavonoides, y tomando en cuenta lo accesible de la especie (localizada dentro de las inmediaciones de CU, UNAM), se consideró *Senna angustifolia* como una especie adecuada para llevar a cabo los estudios de aislamiento y la purificación de la peroxidasa.

Se colectaron 500 gr de *S. angustifolia* que fueron macerados, homogeneizados y filtrados para obtener un extracto con una actividad de peroxidasa de 0.271 u/mg en 20 mL del extracto. El tratamiento con sulfato de amonio solido (40% y 80% respectivamente), dejó un concentrado que fue disuelto en una solución reguladora de fosfatos 60 mM (pH 6.0), el cual presentó una actividad de peroxidasa de 0.116 u/mg en 10 mL del sobrenadante. En este tratamiento la mayoría de los pigmentos fueron separados.

El extracto obtenido fue objeto de una separación en una columna cromatográfica de intercambio iónico (Celulosa DE52) y posteriormente dos separaciones cromatograficas con High Q y High S (Esquema 1), obteniendo una enzima con un peso molecular de aproximadamente 70 kDa (Fig. 20).



ESQUEMA 1: Purificación de la peroxidasa de *Senna angustifolia*



Figura 20: SDS-PAGE (acrilamida 8%); 1: Marcadores de peso molecular. 2: peroxidasa de rábano picante (HRP). 3: Peroxidasa de *Senna angustifolia*.

La enzima obtenida fue utilizada para los ensayos con los substratos antraquinoides.

3.2.2. ACOPLAMIENTO OXIDATIVO FENOLICO CATALIZADO CON LAS PEROXIDASAS.

La reacción de oxidación, de las antraquinonas (rheina, aloe-emodina, emodina, purpurina, quinizarina y alizarina) a través de las peroxidases, se hizo en 1 ml de mezcla de reacción a temperatura ambiente. La mezcla de reacción contenía 1 ml de buffer de fosfatos 60 mM, pH 6.1, 20 μ L de peroxidasa de *S. angustifolia*, 5 μ L de H_2O_2 200 mM y 5 μ L de la antraquinona correspondiente.

Debido a la baja solubilidad de algunos substratos en el medio acuoso, la reacción de acoplamiento oxidativo fue ensayada en con un co-solvente (acetonitrilo), los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Ensayos realizados con la peroxidasa de rábano picante (HRP) y la peroxidasa de *S. angustifolia* (PSA)

	Buffer (100%)	buffer:Acetonitrilo (v/v)
Rheina + H_2O_2 + HRP	Insoluble	(50:50) Soluble
	NR	NR
Rheina + H_2O_2 + PSA	Insoluble	(50:50) Soluble
	NR	NR
Quinizarina + H_2O_2 +HRP	Poco soluble	(50:50) Soluble
	NR	NR
Quinizarina + H_2O_2 +PSA	Poco soluble	(50:50) Soluble
	NR	NR
Alizarina + H_2O_2 + HRP	Soluble	(80:20)
	60%	100%
Alizarina + H_2O_2 + PSA	Soluble	(80:20)
	40%	98%

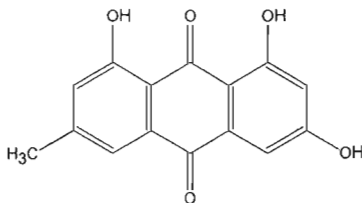
Purpurina + H ₂ O ₂ + HRP	Soluble 100%	-----
Purpurina + H ₂ O ₂ + PSA	Soluble 95%	-----
Emodina + H ₂ O ₂ + HRP	Poco soluble NR	(80:20) 15%
Emodia + H ₂ O ₂ + PSA	Poco soluble NR	(80:20) 10%
Aloe-emodina + H ₂ O ₂ +HRP	Insoluble NR	(50:50) Soluble NR
Aloe-emodina + H ₂ O ₂ +PSA	Insoluble NR	(50:50) Soluble NR

NR: No hay reacción; HRP: Horseradish peoxidase (peroxidasas de rábano picante); PSA: Peroxidasa de *S. angustifolia*.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA PEROXIDASA DE RABANO PICANTE (Horseradish Peroxidase)

Se ensayaron los siguientes substratos con la peroxidasa de rábano picante (HRP): Emodina (5), Alizarina (3) y Purpurina (4).

3.2.2.1. EMODINA (5)



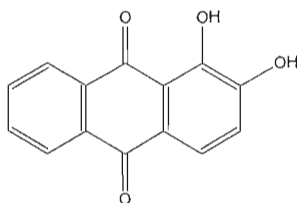
5 Emodina

Tabla 7: Reacción de la **emodina (5)** con la peroxidasa de rábano picante (Horseradish peroxidase)

Condiciones de reacción: Buffer de fosfatos 60 mM pH 6.0 (800 µL); acetonitrilo (200 µL); enzima (300 µL de una solución 1/100; 7.8 µg de prot.); H₂O₂ 1 mM (5 µL)

Tiempo de reacción (min)\min.	6.5 (Area del pico)	% de disminución
0	4144420	
10	3771557	8.9
30	3649885	11.9

3.2.2.2. ALIZARINA (3)



3 Alizarina

Tabla 8: Reacción de la **alizarina (3)** con la HRP.

Condiciones de Reacción: Buffer de fosfatos 60 mM pH 6.0 (1000 μ L); enzima (300 μ L de una solución 1/100; 7.8 μ g de prot.); H₂O₂ 1 mM (5 μ L).

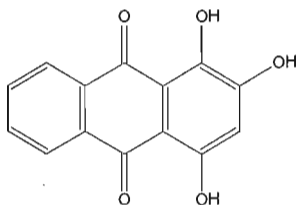
Tiempo de reacción (min)\min.	3.8 (Area del pico)	% de disminución
0	2487031	
10	1595655	35.8
30	1436056	42.2

Tabla 9: Reacción de la **alizarina (3)** con la HRP.

Condiciones de Reacción: Buffer de fosfatos 60 mM pH 6.0 (800 μ L); acetonitrilo (200 μ L); enzima (300 μ L de una solución 1/100; 7.8 μ g de prot.); H₂O₂ 1 mM (5 μ L).

Tiempo de reacción (min)\min.	3.8 (Area del pico)	% de disminución
0	5510056	
10	67007	98
30	-----	100

3.2.2.3. PURPURINA (4)



4 Purpurina

Tabla 10: Reacción de la purpurina (4) con la HRP.

Condiciones de Reacción: Buffer de fosfatos 60 mM pH 6.0 (1000 μ L); enzima (300 μ L de una solución 1/100; 7.8 μ g de prot.); H₂O₂ 1 mM (5 μ L)

tiempo de reacción (min)min.	4.3 (Area del pico)	% de disminución
0	3364353	
10	352850	89.5
30	-----	100

La antraquinona emodina (5) (Tabla 7) reacciona pobremente con la peroxidasa de rábano picante. Las condiciones descritas en la Tabla 7 fueron las óptimas para llevar a cabo la reacción observándose una disminución del pico en un 12% aproximadamente.

La antraquinona alizarina (3) se ensayo con diferentes mezclas de buffer de fosfatos y acetonitrilo, observandose mejor rendimiento cuando la mezcla de reacción es de Buffer y acetonitrilo (800 μ L y 200 μ L respectivamente).

La catálisis de la antraquinona purpurina (4) por la peroxidasa se lleva a cabo en aproximadamente un 100% en buffer de fosfatos, como se observa en la Tabla 8.

De acuerdo a los resultados observados en los cromatogramas de alizarina y purpurina con la peroxidasa de rábano picante (HRP) y la Peroxidasa de *Senna angustifolia*, ambas reacciones dan lugar a la aparición de los mismos picos de productos formados, por lo que se procedió al análisis de estos realizando la reacción a mayor escala con la enzima HRP.

3.2.3. ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE REACCION DE ALIZARINA (3).

La reacción con alizarina (3) se realizó a mayor escala (500 mL) para realizar el estudio de los productos de reacción. La reacción se mantuvo aproximadamente al 100% de reacción. Se realizó la extracción con AcOEt y se obtuvieron los correspondientes productos de reacción para su análisis espectroscópico.

El cromatograma de la reacción mostró la aparición de un pico principal (2.2 min.). Los productos obtenidos fueron objeto de una separación cromatográfica en gel de sílice eluida con AcOEt:MeOH:H₂O (20:3:1) y posteriormente alúmina neutra eluida con CHCl₃, CHCl₃:MeOH (9:1) y MeOH. El producto mayoritario obtenido de las fracciones eluidas con CHCl₃:MeOH, reveló con KOH 5% en etanol de color amarillo y presentó un R_f de 0.82 en cromatografía de capa fina, CHCl₃:MeOH (9:1).

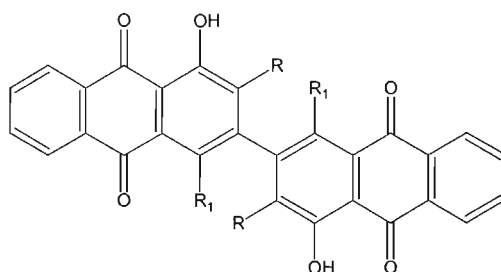
1,1',2,2'-tetrahidroxif[3,3'-biantracen]-9,9',10,10'-tetrona o *3,3'-bializarina* (9). Polvo rojo-amarillo. (R_f=0.82; CHCl₃:MeOH; 9:1 v/v). $\nu_{\max}cm^{-1}$: 1670, 1618 (>C=O). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.29 (m, 4H), 7.9 (m, 4H), 7.77 (2H, s, H-4, H-4'). EI-MS 70 eV, *m/z* (rel. int.): 480 [M]⁺, 452 [M-28]⁺, 424 [M-CO-28]⁺, 396 [M-CO-CO-28]⁺, 240 [M-240]⁺. (Scholl, 1919).

3.2.4. ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE REACCION CON LA PURPURINA (4).

La reacción con purpurina se realizó a mayor escala (500 mL) para realizar el correspondiente estudio de los productos de reacción. La reacción presentó una reducción en el pico del sustrato de aproximadamente el 100%. Los productos de reacción fueron extraídos tres veces con AcOEt. Los extractos se secaron con Na₂SO₄ y se concentraron a presión reducida para realizar el análisis en una HPLC.

El cromatograma de la reacción mostró la aparición de un pico principal (2.7 min.). Los productos obtenidos fueron objeto de una separación cromatográfica en gel de sílice eluida con AcOEt:MeOH:H₂O (20:3:1) y posteriormente alúmina neutra eluida con CHCl₃, CHCl₃:MeOH (9:1) y MeOH, para obtener un solo producto en las fracciones eluidas con CHCl₃:MeOH que reveló con KOH 5% en etanol de color rojo y presentó un R_f de 0.70 en una cromatografía de capa fina, CHCl₃:MeOH (9:1).

1,1',2,2',4,4'-hexahidroxil[3,3'-biantracen]-9,9',10,10'-tetrona o *3,3'-bipurpurina* (**10**). Polvo rojizo-café. (R_f=0.71; CHCl₃:MeOH; 9:1 v/v). $\nu_{\max}^{cm^{-1}}$: 1673, 1623 (>C=O). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.14 (m, 4H), 7.68 (m, 4H). FAB⁺-MS *m/z* (rel. int.): 510 [M]⁺, 481 [M-29]⁺, 452 [M-CO-29]⁺, 386, 256 [M-255]⁺.¹⁰⁷



	R	R ₁
9: 3,3'-bializarina	OH	H
10: 3,3'-bipurpurina	OH	OH
11: 2,2'-biquinizarina	H	OH

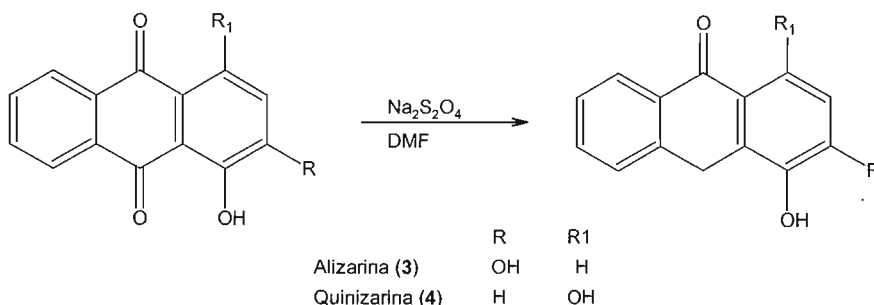
Figura 21. Estructuras de las antraquinonas obtenidas.

3.2.5. ANALISIS DE LA REACCION DE LA HRP CON LAS ANTRACENONAS DE QUINIZARINA Y ALIZARINA.

Mediante el método propuesto por Prinz y col.¹⁰⁶, se obtuvieron las antracenas de alizarina y quinizarina para llevar a cabo las reacciones de acoplamiento oxidativo fenólico con las peroxidasas de *S. angustifolia* y HRP:

El método utilizado reduce selectivamente los carbonilos peri-hidroxilados, por lo que en el caso de la quinizarina, los hidroxilos quedan opuestos al grupo carbonilo.

Procedimiento general para la Reducción de la antraquinonas a antracenas con ditionato de sodio en DMF-H₂O. A una suspensión de antraquinona (2,3; 2.0 g, 4.76-8.96 mmol) en DMF (100 mL) y H₂O (100 mL) se le agregó Na₂S₂O₄ (14.0 g, 80.41 mmol), y la solución se calentó lentamente hasta 90 °C en 30 min bajo N₂. La mezcla se agitó hasta que la reacción fue completa (TLC). La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y después se le agregó 1 L de H₂O y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 X 100 mL). La fase orgánica se lavó con H₂O (3 X 100 mL), se secó con Na₂SO₄, se concentró y purificó por columna cromatográfica para dar la respectiva antracena (7 y 8)



3,4-Dihidroxi-9(10H)-antracena ó Alizarin-antracena (8). 60% de rendimiento; mp 208 °C. Polvo amarillo. (Rf=0.79; CHCl₃:MeOH; 9:1 v/v). $\nu_{\max}^{cm^{-1}}$: 1668 (>C=O). EI-MS 70 eV, *m/z* (rel. int.): 226 [M]⁺, 198 [M-CO]⁺, 170 [M-CO-28]⁺.

1,4-Dihidroxi-9(10H)-antracena ó Quinizarin-antracena (7). 90% de rendimiento; mp 190 °C. Polvo amarillo-naranja. (Rf=0.79; CHCl₃:MeOH; 9:1 v/v). $\nu_{\max}^{cm^{-1}}$: 1675 (>C=O). EI-MS 70 eV, *m/z* (rel. int.): 226 [M]⁺, 198 [M-CO]⁺, 170 [M-CO-28]⁺.

El acoplamiento oxidativo fenólico de los compuestos con la peroxidasa de *S. angustifolia* y HRP fueron realizadas en buffer de fosfatos 60 mM (pH 6.1) y en presencia de H₂O₂ 1 mM a temperatura ambiente por 1 hora (Tabla 6) y la reacción fue seguida por HPLC en una columna de fase reversa eluida con buffer de acetato 100 mM (pH 3):THF (50:50, v/v).

Alizarin-antracena (8)

Tabla 11: Reacción de la **alizarin-antracena (8)** con la peroxidasa de rábano picante (HRP)

Condiciones de Reacción: Buffer de fosfatos 60 mM pH 6.0 (1000 μL); enzima (300 μL de una solución 1/100; 7.8 μg de prot.); H₂O₂ 1 mM (5 μL)

Tiempo de reacción (min)\min.	2.6 (Area del pico)	% del pico	2.8 (Area del pico)	% de aumento
5	190535	3.2	-----	
10	209104	14.9	210465	15
30	207865	7.9	208108	11.9

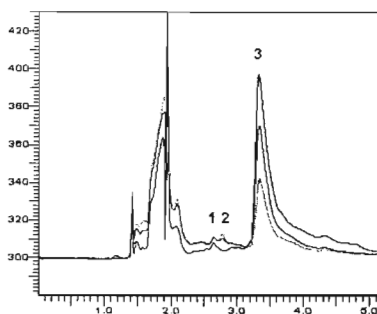


Figura 22. Cromatograma de la reacción de alizarin-antracena con HRP en 10, 20 y 30 min de reacción. 1) pico secundario 2) pico principal (dímero) 3) alizarin-antracena.

Quinizarin-antracena (7)

Tabla 12: Reacción de **quinizarin-antracena (8)** con la peroxidasa de rábano picante (HRP)

Condiciones de Reacción: Buffer de fosfatos 60 mM pH 6.0 (1000 μ L); enzima (300 μ L de una solución 1/100; 7.8 μ g de prot.); H₂O₂ 1 mM (5 μ L)

Tiempo de reacción (min)\min.	2.55 (Area del pico)	% del pico	2.9 (Area del pico)	% del pico
5	627753	15.8	-----	-----
10	31724	3.1	38562	3.2
30	-----	-----	40012	3.5

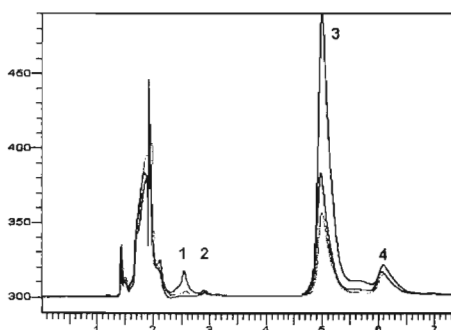
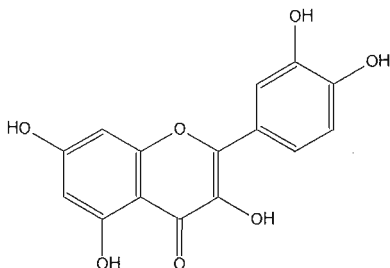


Figura 23. Cromatograma de la reacción de la quinizarin-antracena con la HRP en 0, 20 y 30 min de reacción. 1) pico secundario 2) pico principal (dímero) 3) quinizarin-antracena 4) quinizarina.

3.3. ACOPLAMIENTO OXIDATIVO DE ANTRAQUINONAS CON QUERCETINA

QUERCETINA



9 Quercetina

Tabla 13: Reacción de **Quercetina (9)** con la peroxidasa de rábano picante (HRP)
Condiciones de Reacción: Buffer de fosfatos 60 mM pH 6.0 (1000 μ L); enzima (300 μ L de una solución 1/100; 7.8 μ g de prot.); H_2O_2 1 mM (5 μ L)

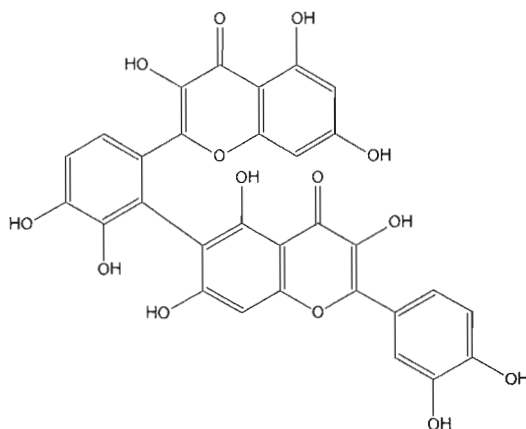
tiempo de reacción (min)\min.	3.39 (Area del pico)	5.12	7.51
0	9620226	-----	-----
10	2832717	301181	120072
20	1540315	325564	114228
30	60095	121100	125157

3.3.1. ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE REACCION DE QUERCETINA.

La reacción con quercetina (9) se realizó a mayor escala (500 mL) para realizar el correspondiente estudio de los productos de reacción. La reacción presentó una reducción del pico del sustrato de aproximadamente el 100%. La reacción se extrajo tres veces con AcOEt. Los extractos se secaron con Na_2SO_4 y se concentraron a presión reducida para su respectivo análisis en HPLC y una posterior separación y purificación. El cromatograma de la reacción mostró cuatro picos que aparecen en forma importante, primero aparece el pico 4, conforme la reacción transcurre los picos 6 y 8 aumentan, mientras el pico 4 disminuye.

Los diferentes productos se separaron por medio de columna preparativa en HPLC, con una mezcla de elución de THF:Buffer de acetatos 100 mM (50:50), obteniéndose en mayor cantidad la fracción correspondiente al pico 4 y el pico 5. Los productos obtenidos fueron objeto de una separación cromatográfica en gel de sílice eluida con AcOEt:MeOH:H₂O (20:3:1) y posteriormente en placa cromatográfica preparativa eluida con $CHCl_3$:MeOH (9:1), para obtener un producto principal que reveló de color amarillo con KOH 5% en etanol y que presenta un R_f de 0.70 en cromatografía de capa fina, $CHCl_3$:MeOH (9:1).

2',6''-biquercetina (9). Polvo amarillo. (Rf=0.71; CHCl₃:MeOH; 9:1 v/v). $\nu_{\max}^{cm^{-1}}$: 1673, 1623 (>C=O). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.70 (d, H-6, J= 1.5 Hz), 7.05 (d, H-8, J = 1.5 Hz), 7.9 (d, H-6', J= 8.9 Hz), 7.16 (d, H-5', J= 8.9 Hz), 7.89 (dd, J = 9.3, 2.1 Hz H-6'''), 7.24 (d, J = 2.1 Hz, H-2''') and 7.08 (d, J = 9.3 Hz, H-5'''), 5.9 (s, H-8''). FAB⁺-MS *m/z* (rel. int.): 602 [M]⁺, 480 [M]⁺, 452 [M]⁺, 424 [M]⁺, 398 [M]⁺, 370 [M]⁺, 342 [M]⁺, 302 [M]⁺.

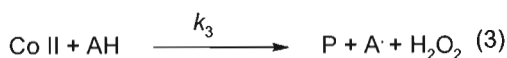
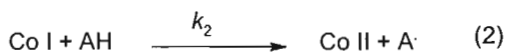


9 2',6''-biquercetina

3.4. ANALISIS CINETICO

FLAVONOIDE QUERCETINA: Constantes cinéticas k_1 y k_3 .

De acuerdo con el estudio cinético de las peróxidasas, se ha aceptado el siguiente mecanismo de reacción:^{67,68}



Condiciones de equilibrio:

$$d [P] / dt = k_3 [CoII][AH] - k_1 [P][H_2O_2] = 0 \quad (4)$$

$$d [Col] / dt = k_1 [P][H_2O_2] - k_2 [CoI][AH] = 0 \quad (5)$$

$$d [CoII] / dt = k_2 [CoI][AH] - k_3 [CoII][AH] = 0 \quad (6)$$

Balance de Masas:

$$[E]_0 = [P] + [CoI] + [CoII] \quad (7)$$

$$[E]_0 = \left\{ (k_3[AH]/k_1[H_2O_2]) + k_3/k_2 + 1 \right\} [CoII] \quad (8)$$

Expresión de velocidad Inicial:

$$v = \frac{2[E]k_3[AH][H_2O_2]}{(k_3/k_1)[AH] + [H_2O_2]} \quad (10)$$

$$-d[AH]/dt = k_2[CoI][AH] + k_3[CoII][AH] \quad (9)$$

$$v = \frac{A[H_2O_2]}{B + [H_2O_2]} \quad (11)$$

$$v = \frac{A[RH]}{B + [RH]} \quad (12)$$

Basándose en el análisis anterior, se obtuvieron las constantes cinéticas k_1 y k_3 para el flavonoide Quercetina mediante el siguiente procedimiento:

Ensayos espectrofotométricos.- Los ensayos espectrofotométricos de la oxidación de quercetina por la peroxidasa de *S. angustifolia* se realizaron a 25 °C en un medio de reacción que contenía concentraciones variables del flavonoide (entre 0.11 y 0.4 mM) y H_2O_2 (0.05-0.2 mM) en buffer de fosfatos 60 mM, pH 6.0. La reacción fue monitoreada por cambios en la absorbancia a 365 nm en los primeros segundos de reacción. La velocidad inicial y la concentración de H_2O_2 fueron fijadas de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$v/2[E]_0 = A[H_2O_2]/(B+[H_2O_2]) \quad (\text{ref. 53-55})$$

Los parámetros A y B fueron usados para calcular las constantes k_1 y k_3 .

Tabla 14: Inversas de las velocidades iniciales de H_2O_2 con concentraciones variables de quercetina.

H_2O_2 /Quercetina	20 mM	10 mM	5mM
0.00905	3.45	3.7	4.54
0.005	2.13	2.63	3.33
0.0025	1.41	1.51	2.5

Tabla 15: Inversas de las velocidades iniciales de Quercetina con concentraciones variables de H_2O_2 .

Quercetina/ H_2O_2	110 mM	200 mM	400 mM
200	4.54	3.33	2.5
100	3.7	2.63	1.51
50	3.44	2.13	1.4

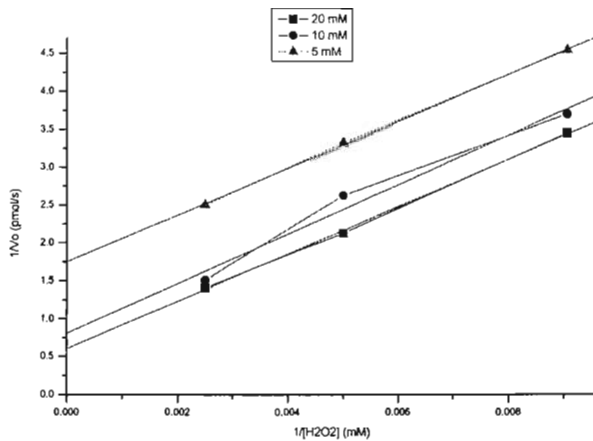


Figura 24. Gráfica de la recíproca de las velocidades iniciales de H₂O₂ con concentraciones variables de quercetina.

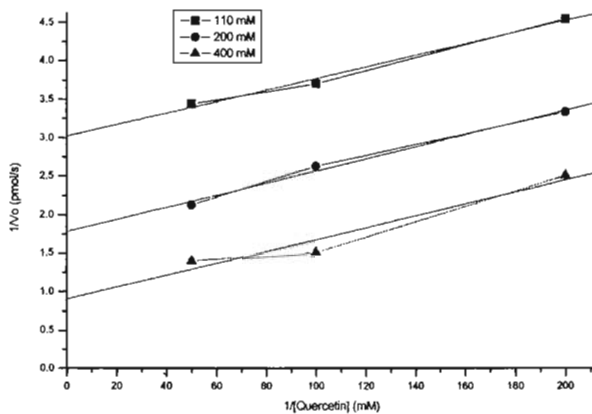


Figura 25. Gráfica de la recíproca de las velocidades iniciales de quercetina con concentraciones variables de H₂O₂.

Tabla 16: Parámetros A y B para quercetina con tres concentraciones de H_2O_2 .

A	B
0.00248	0.3311
0.00442	0.561
0.00851	1.105

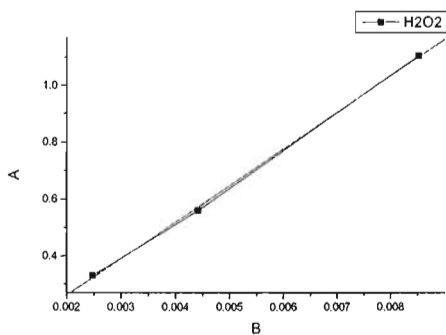


Figura 26. Gráfica de los parámetros A vs B en los cuales se varia el sustrato quercetina para tres concentraciones de H_2O_2 .

Tabla 17: Parámetros A y B para H_2O_2 con tres concentraciones de quercetina.

A	B
516.8377	1.65
405.84	1.23
177.564	0.5727

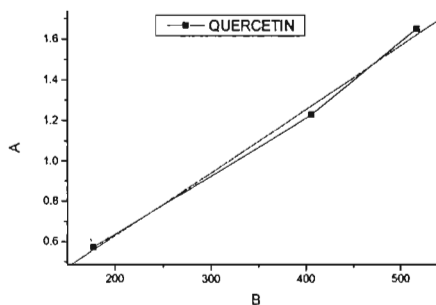


Figura 27. Gráfica de los parámetros A vs B en los cuales se varia el H_2O_2 para tres concentraciones del sustrato quercetina.

ANALISIS CINETICO DE ANTRAQUINONAS: PURPURINA

El análisis cinético de la antraquinona purpurina fue realizado y los parámetros fueron determinados de acuerdo a la ecuación derivatizada de Michaelis-Menten:

$$(2.303/t)\log(S_0/S) = -(1/K_s)(P/t) + (V_m/K_s)$$

Tabla 18: Valores de (P/t) con respecto a la variación del sustrato con respecto del tiempo.

P/t	(2.303/t)log(S ₀ /S)	(2.303/t)log(S ₀ /S)
2.8933E-4	3.0246E-4	
1.7855E-4	1.9447E-4	
1.42E-4	1.5967E-4	
1.1757E-4	1.3478E-4	
2.09667E-4		2.1659E-4
9.96667E-5		1.04442E-4
4.6571E-5		4.90179E-5

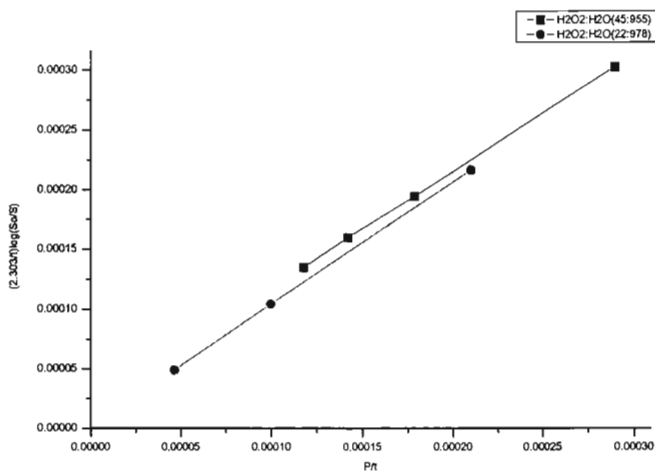


Figura 28. Gráfica de los parámetros P/t en los cuales se varía el sustrato con respecto del tiempo para determinar los valores de V_m y K_s.

4. DISCUSION DE RESULTADOS

4. DISCUSION DE RESULTADOS

En años recientes, diversos productos naturales han sido objeto de estudios biológicos con el objeto de encontrar nuevas opciones terapéuticas para enfermedades en donde los actuales fármacos no exhiben eficacia o presentan diversas reacciones secundarias.

El conocimiento de su acción como potenciales agentes biológicos ha abierto distintas líneas de investigación que abarcan el aislamiento de sus fuentes naturales, ensayos para distintas actividades biológicas, modificaciones químicas para estudios de la relación estructura-actividad biológica y síntesis orgánicas para obtenerlos en mayor cantidad.

Sin embargo, la biosíntesis de algunos productos naturales y el papel biológico que juegan en las plantas superiores u otras fuentes naturales, no ha sido esclarecido.

Como se mencionó, las biantraquinonas son compuestos diméricos productos de la oxidación de monómeros de antraquinonas. Se ha demostrado que la presencia de estos compuestos en especies de *Senna angustifolia* y *Senna acutifolia*, es la responsable de su acción laxante y ello ha originado que los extractos de estas plantas sean utilizados por industrias farmacéuticas como laxantes en la mayoría de sus productos. Sin embargo, se ha demostrado que también poseen propiedades analgésicas, antipiréticas, antimicrobianas, anticancerígenas, antivirales, etc., debido a ello, estos compuestos han sido considerados como potenciales agentes biológicos y diversos estudios se han enfocado en el aislamiento de sus fuentes naturales y sus mecanismos de acción.

A la fecha se desconoce la biogénesis de compuestos fenólicos diméricos (las biantraquinonas y los biflavonoides), mencionándose en algunos casos, que son artefactos formados durante los procesos de purificación y que no son productos naturales *per se*. Sin embargo, evidencias recientes de acoplamiento oxidativo fenólico, proceso en el cual enzimas como las peroxidases y/o lacasas podrían estar involucradas, hacen pensar que estos dímeros son productos naturales biosintetizados por las plantas, muy probablemente como mecanismos de defensa.

4.1. ACOPLAMIENTO OXIDATIVO A TRVES DE LAS LACASAS

Las polifenol oxidases comprenden dos grupos de enzimas: las tirosinasas (monofenol mono-oxigenasas) y las lacasas (p-difenol oxidases). Algunos trabajos recientes sobre el estudio de la función fisiológica de las lacasas indican que este tipo de enzimas pueden estar involucradas en el proceso de polimerización de la lignina. La polimerización de la lignina es un proceso propio de las peroxidases. Sin embargo, hay evidencias de la participación de las lacasas en las etapas iniciales del proceso.

Si las lacasas pueden llevar a cabo el proceso de polimerización de la lignina, también podrían estar involucradas en los procesos de polimerización de algunos otros compuestos fenólicos, entre ellos las antraquinonas y/o los flavonoides.

Los primeros ensayos con las antraquinonas 1-6 y la enzima lacasa en una solución amortiguadora de fosfatos a temperatura ambiente, no mostraron reacción alguna. El análisis que se hizo en el HPLC y en el espectrofotómetro demostró que bajo estas condiciones ninguna de las antraquinonas presenta reacción.

En cambio, en presencia de un generador de radicales libres (ABTS), la reacción se llevó a cabo en aproximadamente un 100% de acuerdo a lo observado en los cromatogramas de la reacción (cromatogramas 1,3 y 5).

Dos reacciones fueron utilizadas como blancos para estos experimentos, el primero entre ABTS y la antraquinona; y el segundo entre el ABTS y la lacasa observándose reacción solo en la segunda. Esto nos indica que la enzima reacciona con el ABTS y los radicales libres generados a través de este sistema reaccionan con la antraquinona y los radicales generados llevan a cabo el acoplamiento oxidativo fenólico que da lugar a la formación de dímeros, trimeros, oligómeros y otros polímeros de la antraquinona.

El análisis a través del HPLC indican una disminución en el pico de la antraquinona de aproximadamente el 100 %, sin embargo no se observan los picos correspondientes a los productos generados. La extracción de los productos de reacción realizada con acetato de etilo y su posterior análisis en el HPLC demuestran la presencia de diversos compuestos.

Aunque para la rheiina el porcentaje de disminución en el pico de la antraquinona fue igual que para la alizarina y la quinizarina, no se detectó la presencia de productos en el análisis por HPLC. Ningún producto o productos fueron separados de la mezcla de reacción usando diferentes solventes (cloroformo, acetato de etilo, etc.).

Para determinar la naturaleza química de los compuestos obtenidos en la reacción de la lacasa y el ABTS con las antraquinonas alizarina y quinizarina, la mezcla de productos obtenidos en la extracción con AcOEt fueron separados por columna preparativa en HPLC con una mezcla de elución THF:Buffer de Acetatos (pH 3) (50:50 v/v).

4.1.1. ALIZARINA

Los productos fueron detectados en HPLC a 250 nm en la mezcla de reacción de la antraquinona alizarina con lacasa. Se separaron 10 fracciones de las cuales 6 fueron de picos bien definidos en el cromatograma (cromatograma 4) y fueron utilizadas para los correspondientes análisis.

El análisis realizado a través del HPLC indica que la antraquinona reacciona en un porcentaje elevado, observándose una reducción del pico correspondiente a la antraquinona. Sin embargo, al realizar la extracción de los productos en la reacción realizada con mayor cantidad de antraquinona, esta se recupera en aproximadamente un 60%.

De acuerdo al mecanismo de reacción de la enzima lacasa con mediadores (Sección 1.3.2.3.), la reacción inicia mediante la interacción del ABTS con la enzima. Los radicales libres generados en el ABTS mediante esta reacción, reaccionan con la antraquinona en donde esta forma un radical libre mediante la ruptura homolítica del enlace O-H fenólico.

Debido a la dilución de las antraquinonas en la reacción, es probable que los radicales generados no tengan suficiente interacción para llevar a cabo el acoplamiento oxidativo y por ello la reacción de acoplamiento podría requerir de más tiempo. La reacción se monitoreó durante 48 hs para determinar el tiempo óptimo para la formación de productos. El ensayo en HPLC de la reacción mostró que a las 12 hs el pico del sustrato había disminuido en un 90% y se procedió a la separación, purificación y elucidación estructural de los productos.

Se obtuvieron los espectros de UV en la mezcla de reacción por medio del arreglo de diodos del HPLC y como observamos en la figura 19, los espectros de UV en la región de 260-320 nm de los productos son diferentes a los de la antraquinona (τ 3.4 min).

Como se esperaba, aumentando el tiempo de reacción se mejoró el rendimiento de los productos, sin embargo el rendimiento es de aproximadamente un 30 % (4 a 10 mg). Debido a la estructura polihidroxiladas de los productos obtenidos, las muestras tienden a

hidratarse rápidamente, lo cual dificultó la purificación de las fracciones. En un primer intento por eliminar el agua se realizó una liofilización. Sin embargo, la presencia de sales del buffer en mayor cantidad que los productos, no permitió la purificación de las fracciones por lo que se optó por una segunda forma de extracción. Obtenidas las fracciones de los productos se les saturó con NaCl y se realizó una extracción posterior con AcOEt. Bajo estas condiciones la extracción de los productos aumentó y se obtuvo suficiente muestra para realizar un estudio de espectroscopia de masas.

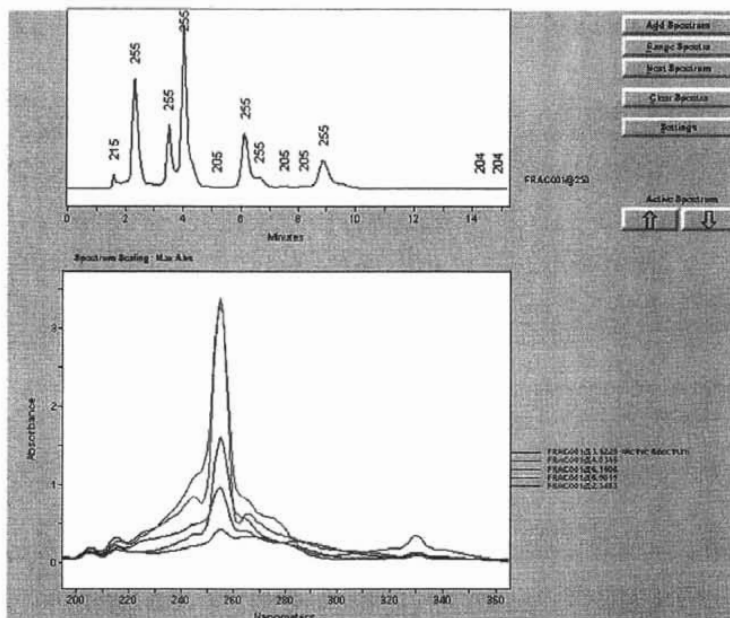


Figura 29: Espectros de UV de los diferentes productos de la alizarina obtenidos en HPLC con arreglo de diodos.

Del análisis de los espectros de masas, realizamos las siguientes observaciones:

En los picos 2 y 4 (ver en Apéndice espectros de masas de las fracciones 2 y 4 de alizarina) detectamos una fragmentación característica de compuestos antraquinoides (m/z de $[M^+ - 28]$ y $[M^+ - 56]$). La fragmentación $[M^+ - 28]$ es producida por la pérdida de monóxido de carbono (CO), característico en este tipo de compuestos. El espectro de masas de la fracción 2 nos da un ion molecular de 536 mientras que para la fracción 4 el pico es de 592. En la formación de los dímeros de alizarina, esperaríamos obtener un ion molecular de 480. Aunque el pico a 480 se encuentra presente en la fragmentación de las muestras, los picos siguientes a m/z 508, 536, 564, 592 (espectro de masas 4 de alizarina), nos sugieren la presencia de un compuesto de más de dos monómeros.

Debido al bajo rendimiento de la reacción, no fue posible purificar completamente las fracciones, por lo que es probable que más de un compuesto este presente en ellas. Por ello, además de un dímero (m/z 480), no se descarta la presencia de un trímero en esta fracción, aunque el ion molecular m/z 720 no se observa.

Sin descartar la presencia de un trimero (u otro polímero), el pico 480 (Fig. 30) podría corresponder al dímero de Alizarina. Se sabe que en ciertos casos, la formación de iones $M^+ + 2$, en las quinonas podría tratarse de reducciones químicas a hidroquinonas.

En el espectro de masas de la fracción 3 de la reacción de la alizarina (ver apéndice), resulta relevante un pico de moderada intensidad a m/z 256, que podría indicar una oxidación de la antraquinona.

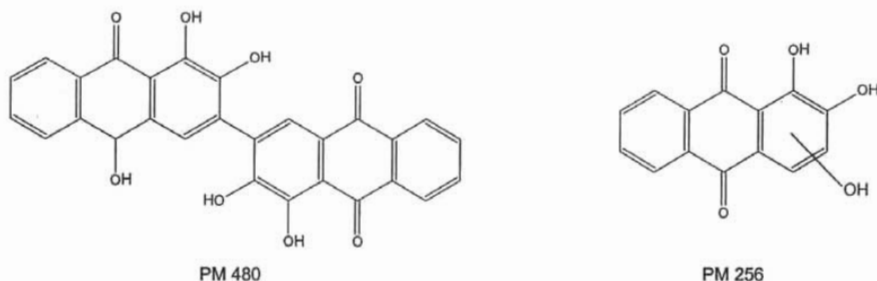


Figura 30. Peso molecular del dímero y la antraquinona

Los métodos de análisis para los dímeros de antraquinonas se han realizado principalmente en el HPLC^{12,13} y muy pocos se han analizado con otras técnicas, tales como la cromatografía de gases.¹⁴ En los casos en que las muestras son del orden de miligramos, la técnica de elección es la resonancia magnética nuclear, la cual nos da con exactitud la estructura química de la molécula.

Como un método alternativo para el análisis de los productos de la reacción de antraquinonas con el sistema mediador de lacasas, se utilizó el análisis de cromatografía de gases. Debido a que compuestos como las antraquinonas son difíciles de detectar en estos análisis debido a su baja volatilización, se utilizó un método para derivatizar antraquinonas. Utilizando estos compuestos, la derivatización se llevó a cabo en las fracciones obtenidas, sin embargo ningún compuesto presente en las fracciones fue detectado en el cromatógrafo de gases.

ENSAYOS COLORIMÉTRICOS: Las antraquinonas en presencia de una base tienden a dar colores rojos o púrpuras, por lo que se puede usar también esta reacción, para diferenciarlas. Así, la fracción 3 presentó una coloración púrpura (igual a la del sustrato), mientras que la fracción 4 la coloración fue roja y las demás presentaron color amarillo. Alizarina en presencia de NaOH da una coloración púrpura. Estos resultados indican la presencia de un compuesto diferente al del sustrato con características antraquinoides. Después de 24 hs el color de la fracción 4 fue púrpura, mientras que las demás fracciones conservaron su color original.

4.1.2. QUINIZARINA

Al igual que la antraquinona alizarina, el análisis con HPLC indica que el pico de la antraquinona quinizarina disminuye en un porcentaje elevado. Sin embargo, en la separación de los productos la antraquinona se recuperaba en una cantidad elevada. Se realizó un experimento monitoreando la reacción a 48 hs. Los resultados fueron parecidos a los obtenidos con alizarina. A las 48 horas notamos una disminución importante del pico

de la antraquinona (mayor al 50%) y un mejor rendimiento en los picos de los productos. Sin embargo, sólo se obtuvieron cantidades del orden de 4-10 mg por fracción. No se observa una diferencia marcada en los espectros obtenidos por medio de la HPLC entre la antraquinona y los productos de reacción.

Los productos de la mezcla de reacción de la quinizarina y la lacasa, fueron separados por medio de la HPLC y detectados a 250 nm (cromatogramas 1 y 2 de quinizarina). De esta separación se obtuvieron 9 fracciones de las cuales solo en 5 fracciones se obtuvo una cantidad suficiente para continuar con el procedimiento analítico.

Para las fracciones obtenidas se siguió el procedimiento utilizado para la antraquinona alizarina, y la mejor extracción de los productos fue con el AcOEt. Solamente de las fracciones 2,4 y 5 se obtuvo lo suficiente para el análisis de masas.

Los espectros de masas proporcionaron la siguiente información:

En los picos 4 y 5 (espectros de masas 4 y 5 de quinizarina) detectamos fracciones que presentan una fragmentación característica de los derivados de antraquinonas (m/z de $[M^+ - 28]$ y $[M^+ - 56]$). La fracción 4 presenta un ion molecular a m/z 564 y otros picos correspondientes a la pérdida de CO. Sin embargo el ion molecular no corresponde a una estructura lógica. Al igual que las fracciones 2 y 4 de alizarina, se observa la presencia de un pico en 480, que podría corresponder al ion molecular $[M+2]$ del dímero de quinizarina. Los picos correspondientes $[M^+ - 28]$ se observan a 452, 424, 396, 368.

De la fracción 2 resulta relevante un pico a m/z 289, que podría indicar una oxidación del substrato. La fracción 8 corresponde al substrato Quinizarina, con un ion molecular m/z 240.

Para determinar la pureza de los productos obtenidos, se realizó un análisis de cromatografía de gases. Las fracciones que contenían los productos se derivatizaron para su posterior análisis, sin embargo en ninguna de las muestras se observa algún pico que pudiera corresponder al producto respectivo.

ENSAYO COLORIMETRICO: La fracción 8 presentó una coloración violeta en presencia de NaOH (igual a la del substrato), mientras que la fracción 4 la coloración fue naranja y las demás presentaron color amarillo. Después de 24 horas el color de la fracción 4 cambió a violeta, mientras que las demás fracciones conservaron su color original.

Se ha demostrado que algunos compuestos policíclicos aromáticos pueden ser oxidados por medio de lacasas fúngicas y algunos compuestos de bajo peso molecular llamados mediadores de la oxidación. Estos compuestos mediadores permiten llevar a cabo el proceso de oxidación en compuestos que no son substratos para estas enzimas.¹⁰⁹ El sistema mediador de lacasa (laccase mediator system; LMS), como comúnmente se le conoce, ha sido utilizado ampliamente para blanquear la pulpa del papel y recientemente se ha utilizado en los procesos de síntesis de algunos compuestos orgánicos.^{106,109,110,111,112,113,114} Otra área de interés ha sido su uso en la degradación de compuestos químicos ambientales como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH).^{115,116,117}

Se han descrito más de 100 compuestos mediadores de este sistema, siendo el ABTS y el HBT (1-hidroxibenzotriazol) los más utilizados.¹¹¹ Sin embargo no está claro si este sistema mediador de la lacasa juega un papel importante en los sistemas naturales. Compuestos como el HBA y el 4-hidroxibenzil alcohol han demostrado ser los más efectivos cuando son usados por las lacasas como mediadores de este sistema y podrían estar involucrados en la degradación natural de compuestos aromáticos en algunos hongos. Generalmente este tipo de compuestos: 1) son secretados por los hongos y se localizan extracelularmente, 2) se presentan *in situ* como metabolitos secundarios en

plantas y 3) son liberados en grandes cantidades durante la degradación microbiana de la ligninocelulosa.¹¹⁶

Otra evidencia que podría demostrar el uso de este sistema en procesos naturales es la habilidad de algunas lacasas secretadas por hongos para degradar compuestos de lignina u otros compuestos que no son fácilmente degradados, así como la importancia de estas enzimas para degradar la madera.

Sin descartar la posibilidad de que este sistema pudiera estar involucrado en la biogénesis de algunos compuestos en las plantas superiores, nuestros resultados demuestran que la participación de este sistema en la biogénesis de biantraquinonas es poco probable. Durante el aislamiento y purificación de la peroxidasa de *Senna angustifolia*, no se detectó la enzima lacasa. En cada paso del proceso de purificación se utilizó el substrato syringaldazine para detectar esta enzima. Debido a que nuestros procedimientos de purificación no demostraron la presencia de la enzima lacasa, no fue necesario el aislamiento de posibles mediadores presentes en esta especie.

Aunque la reacción de las lacasas utilizando mediadores pudiera no estar involucrado en la biogénesis de bioantraquinonas, un estudio de este sistema con las antraquinonas podría ser relevante para la síntesis de estos compuestos.

Compuestos como el ABTS y el DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) han sido utilizados como sistemas generadores de radicales libre estables para medir el potencial antirradical de algunos compuestos como los flavonoides. Estos estudios han demostrado la formación de compuestos diméricos a través de estos compuestos.^{117,118,119} El procedimiento general de estos estudios generalmente involucra la participación de las peroxidases, las cuales generan una especie ABTS^{•+}. El radical libre formado interacciona con el compuesto llevando a cabo una reacción de propagación y de extinción de los radicales libres para generar los dímeros o polímeros del compuesto.



El uso de esta biotecnología en la síntesis de estos compuestos podría ser útil por lo que un estudio mas detallado de los resultados obtenidos en este trabajo, podría mejorar el rendimiento de estos compuestos con lo cual se podría llevar a cabo un análisis de su actividad biológica.

4.2. ACOPLAMIENTO OXIDATIVO MEDIADO POR LAS PEROXIDASAS.

El acoplamiento oxidativo fenólico contribuye a la biogénesis de diferentes compuestos naturales, entre ellos algunos alcaloides (benzilisoquinolinas, alcaloides de *Amaryllidaceas*, colchicina, etc.), flavonoides, ligninas, antibioticos (vancomicina), etc. La reacción involucra la formación oxidativa de radicales fenolato y promueve la recombinación intra- o intermolecular para formar nuevos enlaces C_{aromático}-C_{aromático} y/o C-O. En años recientes se ha demostrado que las peroxidases contribuyen eficientemente a la catálisis oxidativa de enlaces C-O y/o C_{aromático}-C_{aromático} de varias tirosinas, hidroxifenilglicinas, flavonoides y otros compuestos fenólicos y se han relacionado en los

procesos de biogénesis de estos compuestos en plantas superiores. Se ha sugerido que el acoplamiento oxidativo fenólico forma los dímeros de las antraquinonas y/o de las antracenonas. Sin embargo, a la fecha no hay trabajos que demuestren la participación de estas enzimas en la última etapa de la biogénesis.

En el presente trabajo exploramos la posible participación de las peroxidadas en la ruta biogénica de las biantraquinonas. Para ello se utilizó una enzima purificada de *Senna angustifolia* y la peroxidasa HRP.

La peroxidasa de *Senna angustifolia* y la HRP fueron ensayados con las respectivas antraquinonas 1-6. Con excepción de emodina y rheina, las antraquinonas utilizadas no son metabolitos secundarios propios de *Senna angustifolia*. Las antraquinonas 1-6 fueron seleccionadas de acuerdo a los siguientes criterios:

- Emodina ha sido aislada como uno de los monómeros más comunes en los dímeros de antraquinona.
- Rheina es un monómero propio de los senósidos.
- Alizarina, quinizarina, purpurina son las antraquinonas con menor cantidad de hidroxilos, lo cual puede facilitar el estudio de la reacción.

De los resultados observados en las reacciones de oxidación a través de la actividad de la HRP y de la peroxidasa de *Senna angustifolia* con las diferentes antraquinonas, sólo dos de los substratos presentaron reacción, mientras que para las demás antraquinonas, el rendimiento en la reacción de oxidación es pobre o nulo (Tabla 3 y 6, secc. resultados).

REACCION GENERAL DEL ACOPLAMIENTO OXIDATIVO FENOLICO MEDIADO POR LAS PEROXIDASAS

De acuerdo al mecanismo general propuesto para las peroxidadas, el acoplamiento de las antraquinonas se podría llevar a cabo como se muestra en la figura 31:

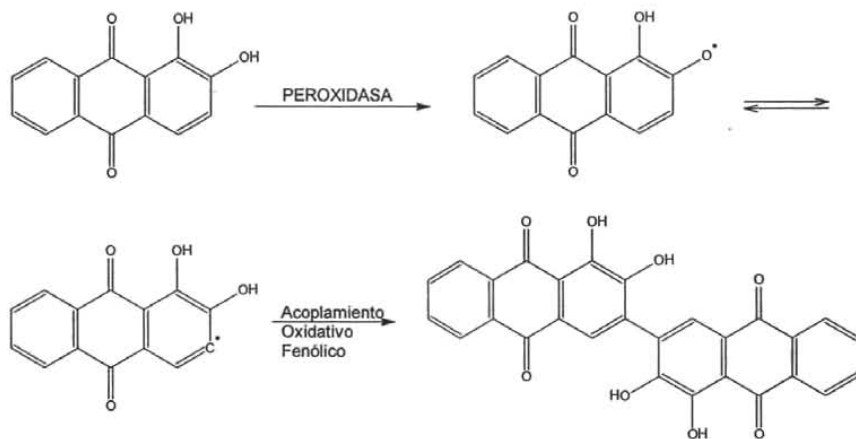


Figura 31. Mecanismo general del acoplamiento oxidativo fenólico.

4.2.1. ALIZARINA

Debido a la baja solubilidad de la antraquinona alizarina en medios acuosos, se ensayo con diferentes mezclas de buffer de fosfatos 10 mM (pH 6) y acetonitrilo, observándose un mejor rendimiento cuando la mezcla de reacción es 8:2 (800 μ L y 200 μ L respectivamente). La oxidación de la antraquinona purpurina, catalizada por la peroxidasa, se llevó a cabo al 100% en buffer de fosfato (Tabla 4 y 7).

De acuerdo a los resultados observados en los cromatogramas de alizarina y purpurina con las enzimas de rábano picante (HRP) y la Peroxidasa de *Senna angustifolia*, ambas reacciones dan lugar a la aparición de los mismos picos de productos formados, por lo que se procedió al análisis de éstos, realizando la reacción a mayor escala con la HRP.

ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE REACCION DE ALIZARINA. La reacción con alizarina se realizó a mayor escala (500 mL) para realizar el correspondiente estudio de los productos de reacción. La reacción mantuvo aproximadamente el 100% de disminución en el pico del sustrato (Fig. 33). Se realizó la extracción con AcOEt y se obtuvieron los correspondientes productos de reacción para su respectivo análisis espectroscópico.

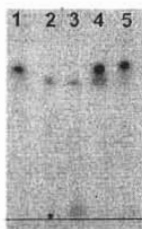


Figura 32. Cromatografía en capa fina de las fracciones de la reacción de Alizarina con la HRP: 1 y 5) Alizarina; 2 y 3) Producto mayoritario (dímero); 4) Mezcla

El cromatograma de la reacción mostró la aparición de un pico principal (2.8 min.). Los productos obtenidos fueron objeto de una separación cromatográfica en gel de sílice eluida con AcOEt:MeOH:H₂O (20:3:1) y posteriormente Alúmina neutra eluida con CHCl₃, CHCl₃:MeOH (9:1) y MeOH, para obtener un producto en las fracciones eluidas con CHCl₃:MeOH que reveló con KOH 5% en etanol de color amarillo y que presenta un R_f de 0.82 en cromatografía de capa fina, CHCl₃:MeOH (9:1) (Fig. 32).

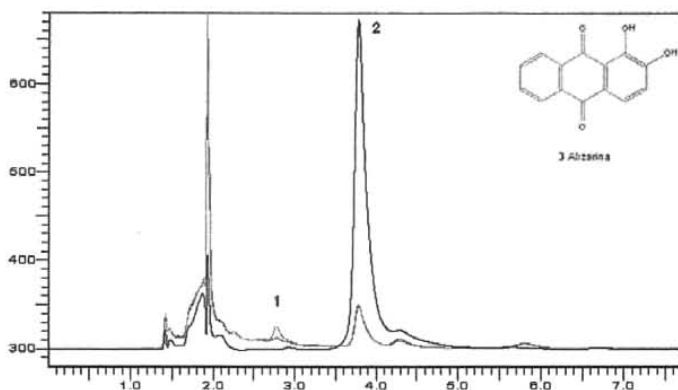


Figura 33. Cromatograma 8: Reacción de Alizarina con la HRP: 1) Productos de la reacción, 2) Alizarina

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS

El espectro de masas (IE^+) presenta un ion molecular m/z 480 correspondiente al peso molecular del dímero de alizarina, y una posterior fragmentación de m/z 452, 424, 398, debido a las pérdidas de CO y un pico de 240 correspondiente al monómero de alizarina.

El espectro de resonancia magnética de protón muestra un sistema AB en δ 7.9 y 8.2 ppm, correspondientes a los protones 5,5',6,6',7,7' y 8,8' del dímero. Un singulete en δ 7.7 ppm correspondiente al H-4 y H-4'. Lo cual confirma la presencia del dímero de 3,3'-bializarina.

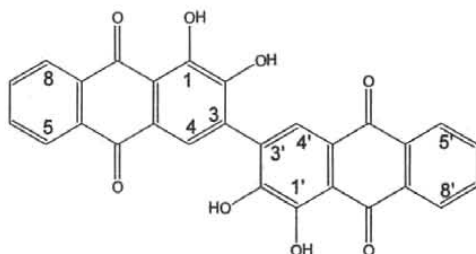


Figura 34. Estructura química de la 3,3'-bializarina

4.2.2. PURPURINA

La antraquinona purpurina presentó buena solubilidad en agua, por lo que no fue necesario utilizar un cosolvente. La reacción se llevó a cabo en buffer de fosfato 10 mM, pH 6.0, tal como se indica en la sección de resultados. El análisis del desarrollo de la

reacción en HPLC mostró que el pico del sustrato disminuía en un 90% en un tiempo aproximado de 45 min.

ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN DE PURPURINA. La reacción con purpurina se realizó a mayor escala (500 mL) para realizar el correspondiente estudio de los productos de reacción. La reacción mantuvo aproximadamente el 100% de disminución en el pico del sustrato (Cromatograma 6). Se realizó la extracción con AcOEt y se obtuvieron los correspondientes productos de reacción para su respectivo análisis espectroscópico.



Figura 35. Cromatografía en capa fina de las fracciones de la reacción con Purpurina: 1 y 2) Purpurina; 3) Producto mayoritario (dímero).

El cromatograma de la reacción mostró la aparición de un pico principal (2.7 min, fig. 36). Los productos obtenidos fueron objeto de una separación cromatográfica en gel de sílice eluida con AcOEt:MeOH:H₂O (20:3:1) y posteriormente Alúmina neutra eluida con CHCl₃, CHCl₃:MeOH (9:1) y MeOH, para obtener un producto en las fracciones eluidas con CHCl₃:MeOH que reveló con KOH 5% en etanol de color rojo y que presenta un R_f de 0.70 en cromatografía de capa fina, CHCl₃:MeOH (9:1)(Fig. 35).

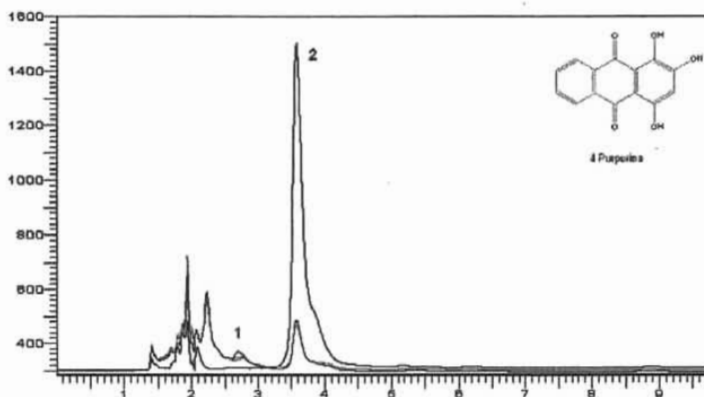


Figura 36. Cromatograma de la reacción con Purpurina: 1) Productos de la reacción, 2) Purpurina

ANALISIS ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS

El Espectro de Masas (FAB) presenta un ion molecular m/z 510 y correspondiente al peso molecular del dímero de purpurina, y una posterior fragmentación m/z 481, 453, 425, correspondientes a las pérdidas CO y un pico de 256 correspondiente al monómero de purpurina.

El espectro de Resonancia Magnética de Protón muestra un sistema AB en 7.7 y 8.1 ppm, correspondientes a los protones 5,5',6,6',7,7' y 8,8' del dímero. La ausencia de un singlete a 6.65 ppm, correspondiente al H-3 del substrato purpurina, confirman la presencia del dímero de purpurina (1,1',2,2',4,4'-hexahidroxil[3,3'-biantracén]-9,9',10,10'-tetrona)(Espectros de RMN de la sección de purpurina).

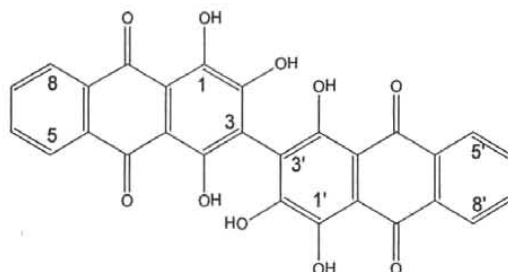


Figura 37. Estructura química de la 3,3'-Bipurpurina

El análisis estructural de las antraquinonas utilizadas sugería que la reacción requería de un hidroxilo en la posición 3 en la antraquinona para poder llevar a cabo el acoplamiento oxidativo. Sin embargo el resultado de emodina con la HRP, de apenas un 12%, nos indica que un hidroxilo en la posición 3 no es suficiente para una reacción óptima con la enzima para llevar a cabo la formación del dímero.

La reacción inicial de la enzima con compuestos fenólicos requiere de la disposición de un grupo OH fenólico para poder llevar a cabo la formación de la especie radical. Analizando la estructura de la antraquinona emodina, los protones de los hidroxilos podrían presentar quelatación con el grupo carbonilo adyacente. Bajo estas condiciones los hidroxilos estarían impedidos para interactuar con la enzima, e impedir que la reacción se lleve a cabo.

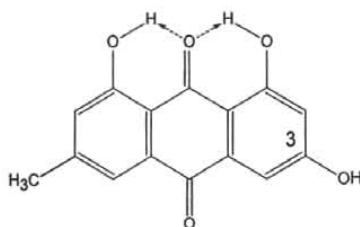


Figura 38. Quelatación del grupo carbonilo en la antraquinona

Para demostrar esta hipótesis se ensayo la antraquinona emodina a diferentes pH, sin embargo en ninguno de ellos hubo una reducción importante en el pico del sustrato (Tabla 18).

TABLA 18: Ensayo de la antraquinona Emodina a diferentes pH's.

	15 min.	30 min.
pH 4	NR	NR
pH 5	NR	NR
pH 6	10%	12%
pH 7	9%	11%
pH 8	NR	NR
pH 9	NR	NR

NR: No hay reacción.

Como se menciona en trabajos anteriores, los precursores de algunas antraquinonas (antracenonas y/o dehidroantracenonas) podrían estar involucradas en la biogénesis de los dímeros. Los aislamientos de algunos de estos precursores en trabajos realizados con técnicas de marcación específica para la elucidación de la biogénesis de antraquinonas, sugieren el acoplamiento oxidativo en estas especies para formar un dímero de antracenona. Posteriores reacciones de transformación (oxidación, metilación, etc.) podrían dar lugar a los dímeros de antraquinonas.

Esta hipótesis fue estudiada en el presente trabajo, para ello llevamos a cabo la reducción selectiva de uno de los carbonilos de quinizarina y alizarina. La reducción, de acuerdo al método propuesto por Prinz y col.¹⁰⁶, dio excelentes rendimientos cercanos al 100% (Sección de resultados y espectros, fig. 39).

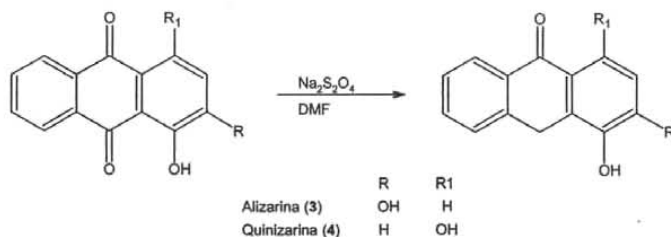


Figura 39. Reacción de reducción de las antraquinonas a antracenonas

La cromatografía de capa delgada (fig. 40) demuestra una buena purificación de las antracenonas obtenidas. Las estructuras de las antraquinonas fueron obtenidas del análisis de los espectros de resonancia magnética de protón y de carbón, y los datos fueron comparados con los reportados en la literatura para estos compuestos.

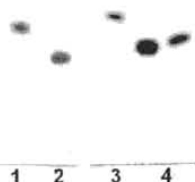


Figura 40. Cromatografía de Capa Delgada de las antracenas obtenidas: 1) Quinizarina; 2) quinizarin-antracena; 3) alizarina; 4) alizarin-antracena

4.3. ACOPLAMIENTO OXIDATIVO FENOLICO CON LAS ANTRACENAS.

Las antracenas obtenidas, alizarin-antracena y quinizarin-antracena, fueron ensayadas con las peroxidasas de *Senna angustifolia* y de rábano picante (HRP), como se observa en la tabla 4. En ambos casos se observa una disminución del pico correspondiente a cada antracena cuando fueron analizadas en HPLC, lo cual es indicativo de que ambas antracenas fueron utilizadas como sustratos.

Cuando la reacción se llevo a cabo con la HRP, la quinizarin-antracena fue mejor sustrato que la antraquinona quinizarina. Con la antracena de quinizarina se observa una reducción del pico del sustrato de aproximadamente un 80%, mientras que la antraquinona quinizarina presenta un 10% de reacción (Fig. 41).

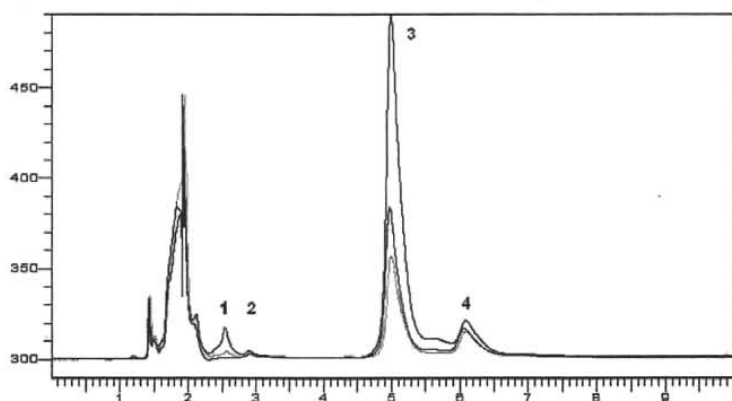


Figura 41: Bioconversión de la antracena de quinizarina con la HRP. 1) Pico del posible intermediario del dímero de quinizarina. 2) Producto principal: dímero de quinizarina. 3) Quinizarin-antracena 4) Quinizarina.

El análisis del cromatograma de reacción para la antracena de quinizarina, muestra que en los primeros 5-10 minutos de reacción existe la formación de un pico a los 2.55

minutos de retención. En el transcurso de la reacción, este pico disminuye mientras se observa la aparición de otro a 2.95 min de retención, el cual se mantiene hasta que la reacción finaliza.

La separación de los productos y el análisis de ellos a través de la espectroscopia de masas, indican la formación de un producto con peso molecular de m/z 480, correspondiente al dímero de quinizarina. La fragmentación m/z 452, 423, correspondientes a las pérdidas CO y un pico de 256 correspondiente al monómero de quinizarina, indican la presencia del dímero.

La antracenona alizarina presenta el mismo progreso en el transcurso de la oxidación (Fig. 42). En este caso se observa la aparición de un primer pico a los 2.3 min cuando han transcurrido 10 minutos de reacción. Conforme la reacción avanza, este pico disminuye mientras un segundo aparece a 2.8 min, el cual se mantiene hasta que la reacción finaliza. Los productos de reacción fueron separados por cromatografía de columna y purificados para su elucidación estructural. El producto mayoritario correspondió al segundo pico, el cual presenta el mismo tiempo de retención que el dímero de alizarina, obtenido de la reacción de la antraquinona de alizarina con las peroxidasa, y fue confirmado por medio de la espectroscopia de masas.

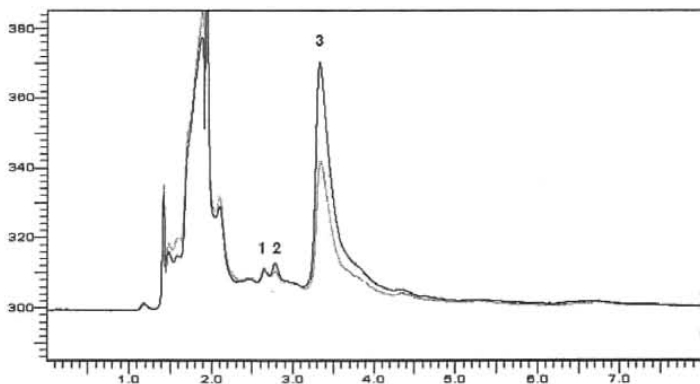


Figura 42: Bioconversión de la antracenona de Alizarina con la HRP. 1) Píco del posible intermediario del dímero de Alizarina. 2) Producto principal: dímero de Alizarina. 3) Alizarin-antracenona.

En ambos casos, con las antracenonas de alizarina y quinizarina, los productos obtenidos durante el aislamiento y la purificación correspondieron al dímero de ambas antraquinonas. El aislamiento y caracterización del compuesto del primer pico se vio restringida debido a la velocidad con la cual es consumido o transformado en el transcurso de la reacción, y a las cantidades utilizadas en el ensayo.

Sin embargo, por el mecanismo de acción conocido de las peroxidasa y los dímeros obtenidos como productos finales de la catálisis, podemos hacer las siguientes conjeturas: El análisis de los resultados de la reacción con las antracenonas podrían indicar que la formación de los dímeros ocurre en un proceso de dos etapas, en la primera las antracenonas son oxidadas por la enzima para llevar a cabo el acoplamiento oxidativo y

formar un dímero de antracenona. En la siguiente etapa este dímero de antracenona es oxidado al correspondiente dímero de antraquinona. Este último proceso es factible debido a las condiciones oxidantes del medio donde se desarrolla la reacción (Fig. 43).

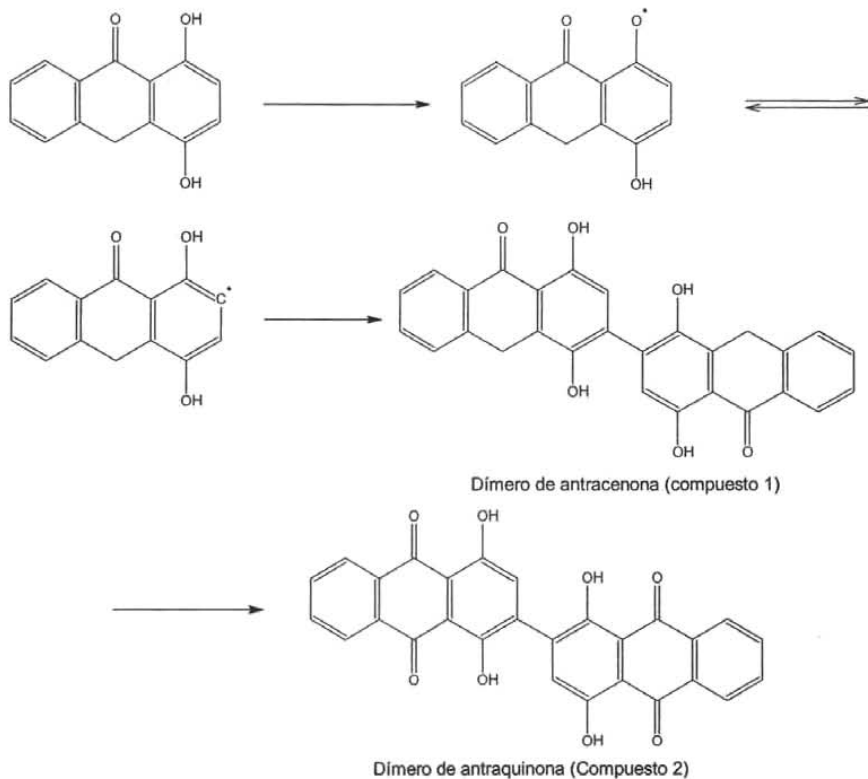


Figura 43. Mecanismo propuesto para la oxidación catalítica de antracenonas con peroxidasas.

Los Resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que las peroxidasas de *Senna angustifolia* y de rábano picante (HRP) oxidan de forma eficiente a las antraquinonas alizarina y purpurina (1,2-hidroxiantraquinonas) a sus respectivos dímeros. La habilidad de la peroxidasa purificada para sintetizar biantraquinonas de antracenonas y/o antraquinonas sugiere que ambos intermediarios pueden ser usados para producir los dímeros.

Estos datos soportan evidencias que las peroxidasas pueden estar involucradas en la biosíntesis de estos compuestos en sus fuentes naturales.

4.4. ACOPLAMIENTO OXIDATIVO DE LA QUERCETINA MEDIADO POR LAS PEROXIDASAS

El flavonoide quercetina fue ensayado con la HRP, observándose una disminución del pico base en un 100% en un tiempo de reacción de 10 minutos, como se muestra en el cromatograma 12 (Sección de cromatogramas y espectros de quercetina). La reacción se hizo por triplicado, teniendo como blancos tres reacciones mas: en la primera se adiciono solamente el substrato, la segunda el substrato y peróxido de hidrógeno y en la tercera el substrato con la enzima. En ninguno de los blancos hubo una disminución significativa del pico del substrato

La reacción se escaló a 500 mL para poder obtener suficiente producto de reacción y realizar el respectivo análisis.

En la reacción a mayor escala se observa la aparición de varios picos, correspondientes a los diferentes productos. Cuatro picos aparecen de forma importante, primero aparece el pico 4, conforme la reacción transcurre los picos 6 y 8 aumentan, mientras el pico 4 disminuye.

Los diferentes productos se separaron por medio de columna preparativa en HPLC, con una mezcla de elución de THF:solucion reguladora de Acetatos 100 mM (50:50), obteniéndose en mayor cantidad la fracción correspondiente al pico 4 y el pico 6 en importancia siguiente.

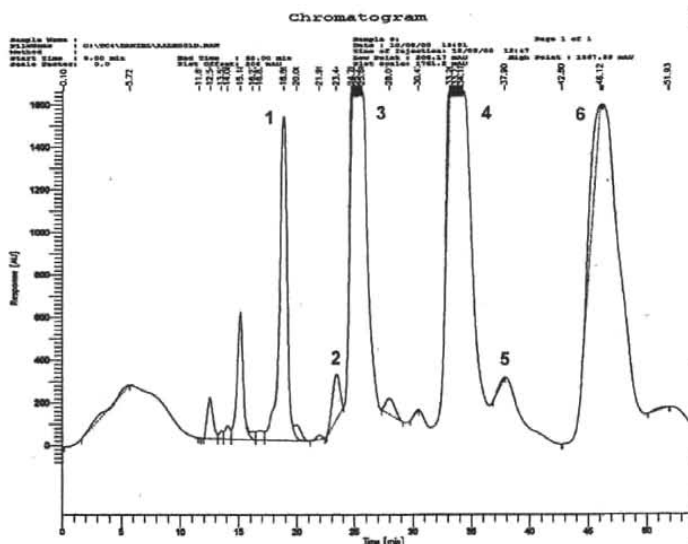


Figura 44: Productos obtenidos de la reacción de la quercetina con la HRP

Del pico 4 se obtuvieron los correspondientes espectros de RMN de protón y COSY (Fig. 45). Del análisis de estos espectros podemos observar lo siguiente: un sistema AB en 5.6-5.7 ppm y un sistema ABX en 7.8-8.0 característico del substrato quercetina. El flavonoide

quercetina se obtiene en un tiempo de retención muy cercano al del producto. Sin embargo un singulete en 5.9 ppm y un sistema AB en 7.1 ppm con una $J = 8.7$ Hz correspondiente a un acoplamiento orto, nos indican la presencia de un sistema diferente al de la quercetina.

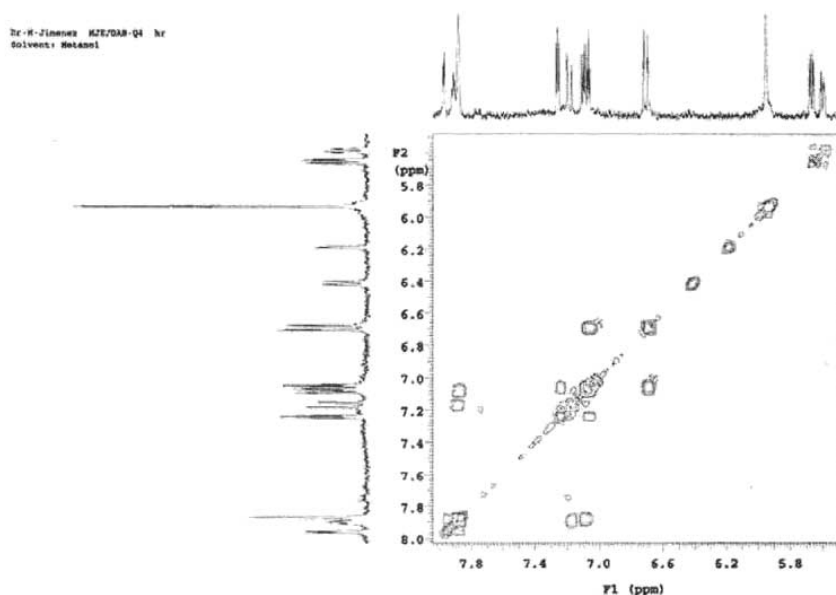
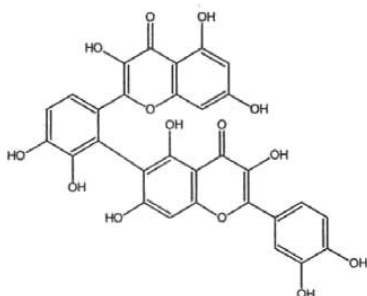


Figura 45. Análisis del espectro de correlación heteronuclear (HETCOR) del pico 4

La presencia de un singulete nos indica que el sistema AB correspondiente al anillo de quercetina desaparece, y la presencia de un sistema AB con una constante de acoplamiento orto, nos indica que uno de los protones en el sistema ABX ha sido sustituido, en base a esos datos, la estructura resultante puede ser un biflavonoide con la siguiente caracterización:



El Espectro de Masas (IE+) no presenta un ion molecular, pero si presenta una fragmentación característica de estos compuestos. Picos adicionales a 480, 452, 424, 398, 370, 352 y 342, los cuales son atribuidos a la fragmentación en uno de los monómeros del dímero y un pico base en 302 característico del flavonoide quercetina (Fig. 46).

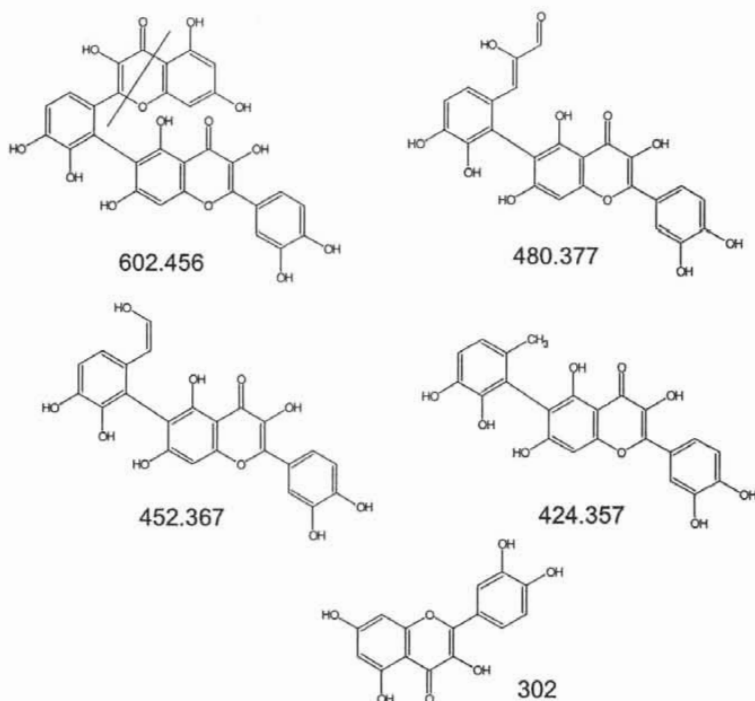


Figura 46. Fragmentación del dímero de quercetina.

Diferentes estudios revelan la capacidad antioxidante y pro-oxidante de los flavonoides, especialmente la quercetina por ser uno de los flavonoides más ubicuos en la naturaleza. La actividad pro-oxidante se ha atribuido al hecho de que puede sufrir autoxidación cuando se disuelve en soluciones amortiguadoras. Debido a la presencia del carbonilo C-4 y del doble enlace C2-C3 del flavonoide se favorece la formación de un compuesto o-quinoido dando posibilidades de formar aductos quinoides, los cuales son más reactivos que las propias quinonas (fig. 47). Este tipo de aductos es especialmente interesante en la relación que existe con la actividad citotóxica, mutagénica y posiblemente carcinogénica de la quercetina.^{120,121,122}

Algunos estudios previos han demostrado la formación de un radical quercetin-o-semiquinona producido por las peroxidasas^{123,124,125} el cual ha sido estabilizado para su estudio formando complejos de Zn⁺². El análisis de los productos de reacción de la quercetina con peroxidasas en estos estudios, ha revelado la formación de al menos 20

compuestos diferentes,¹²⁶ dichos estudios concuerdan con otros realizados con flavonoides como el kaempferol^{124,127} y la catequina.¹²⁸

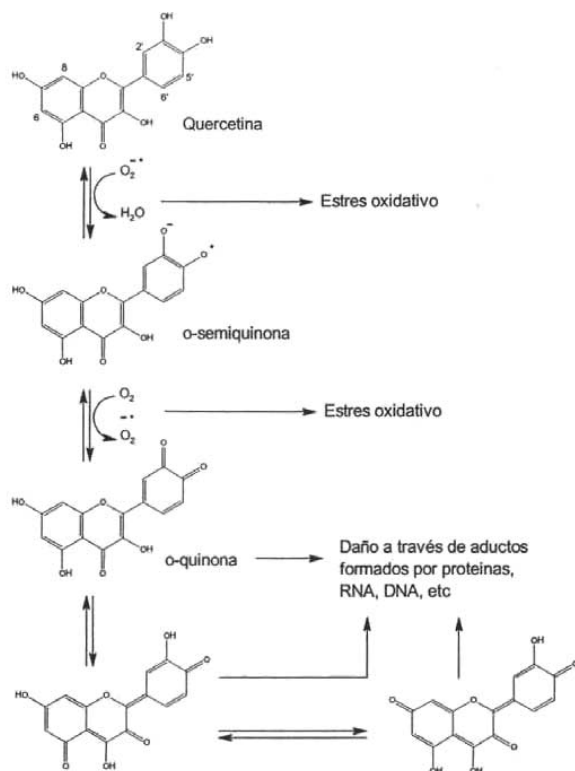


Fig. 47. Ruta oxidativa de la quercetina a quercetin-o-semiquinona, quercetin-o-quinona y quercetin-p-quinona, indicando la formación de especies reactivas de oxígeno y de quinonas electrofílicas.

Para el flavonoide quercetina los compuestos aislados comprenden la incorporación de oxígeno en la estructura del flavonoide, la degradación enzimática a ácidos benzóicos, así mismo estos ácidos pueden ser transformados por hidroxilación, descarboxilación y fisión anular, dejando una gran variedad de compuestos polares sin identificar.

Los resultados obtenidos en estos estudios y en el presente trabajo demuestran la complejidad en el estudio de esta reacción entre las peroxidasas y los flavonoides, especialmente la quercetina.

Entre la diversidad de productos aislados en este tipo de reacciones, el dímero purificado en el presente trabajo no ha sido reportado, sin embargo el posible mecanismo por el cual es formado, estaría de acuerdo con el propuesto para la formación de otros compuestos díméricos reportados en este tipo de reacciones (fig. 48).

No fue el objetivo de este trabajo analizar esta reacción en detalle. Sin embargo el análisis en la HPLC demuestra que en los primeros minutos de reacción un producto es formado en mayor proporción. Si la reacción continúa en los siguientes minutos, la formación de otros productos es seguida por la disminución en el pico de quercetina, como se muestra en el cromatograma.

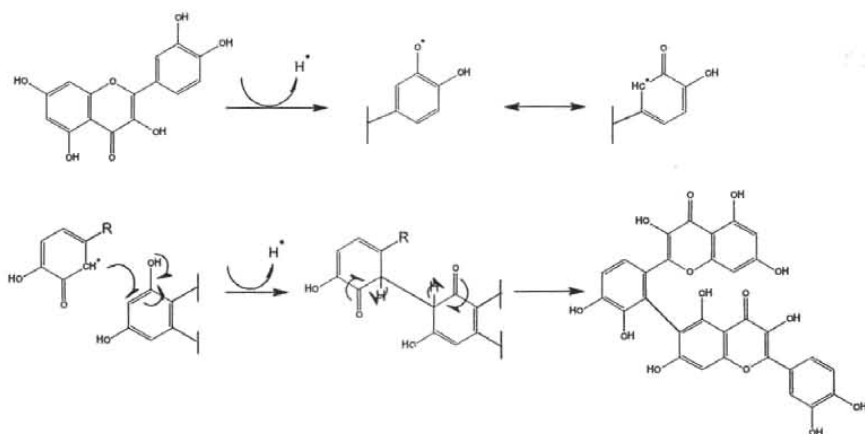


Fig. 48. Mecanismo de reacción propuesto para la formación de 2',6''-biquercetina

ANALISIS CINETICO

La Peroxidasa de *Senna angustifolia* sigue la cinética típica de Michaelis-Menten, con saturación de la enzima a elevadas concentraciones de sustrato. Para calcular las constantes microscópicas (k_1 y k_3) para la oxidación del sustrato por esta fracción de peroxidasa, las velocidades de oxidación del sustrato se fijaron para cada concentración de quercetina y de H_2O_2 de acuerdo al mecanismo para la reacción de peroxidasa.

Para concentraciones no inhibitorias, las velocidades iniciales se fijaron por la siguiente reacción:

$$v = \frac{A[H_2O_2]}{B + [H_2O_2]}$$

Donde $A = 2[E]k_3[RH]$ y $B = (k_1/k_3)[RH]$. La gráfica de doble recíproca ($1/v$ vs $1/[H_2O_2]$) nos permite calcular los valores de A y B para cada concentración de Quercetina.

En la Figura 8 observamos el gráfico de la doble recíproca con H_2O_2 como el sustrato variable. En la figura 10 observamos el gráfico de los valores de A vs B para cada concentración de quercetina. Del ajuste lineal ($A = 2[E]k_1B$), es posible calcular el valor de k_1 (Constante de Formación del Compuesto I) para la reacción de oxidación llevada a cabo por la peroxidasa.

De la misma manera, la dependencia de v sobre [RH] puede ser escrita como:

$$v = \frac{A[RH]}{B + [RH]}$$

Donde $A = 2[E]k_1[H_2O_2]$ y $B = (k_1/k_3)[H_2O_2]$. La gráfica de la doble recíproca ($1/v$ vs $1/[RH]$) nos permite calcular los valores de A y B para cada concentración de H_2O_2 . La figura 7 y 9 nos presenta las gráficas de la doble recíproca y del ajuste lineal. De esta última ($A = 2[E]k_1B$) es posible calcular los valores de k_3 (Constante de Reducción del Compuesto II) para la reacción mediada por la peroxidasa. En todos los casos, los valores de k_1 y k_3 se calcularon a un pH óptimo para las oxidaciones catalizadas por las peroxidasa.

Los resultados obtenidos se puso determinar las constantes k_1 y k_3 , siendo $9.1 \mu M^{-1}s^{-1}$ y 8.6 para el guayacol y $3.1 \mu M^{-1}s^{-1}$ y $19.2 \mu M^{-1}s^{-1}$ para Quercetina.

De los valores obtenidos para la constante k_1 , se puede deducir que la peroxidasa es capaz de oxidar sustratos fenólicos del tipo de los flavonoides. Examinando la constante de formación del Compuesto I (k_1) y comparandolo con aquellos obtenidos para otro tipo de compuestos fenólicos, se observa que existe una variación importante. Estos varían desde 1.1 a $1.7 \mu M^{-1}s^{-1}$ para compuestos fenólicos polihidroxilados (quercetina, miricetina y trans-resveratrol) con la HRP,¹³ mientras que valores del orden de $10.4 \mu M^{-1}s^{-1}$ son observados para compuestos tipo guayacol (alcohol coniferil). Aunque *a priori* ha sido difícil explicar a nivel molecular como la naturaleza del sustrato influye en la constante de velocidad de la formación del Compuesto I, es un hecho que se ha descrito en la

literatura. Sin embargo, como se observa, los valores son mas grandes para compuestos tipo guayacol que para aquellos compuestos fenólicos polihidroxilados.

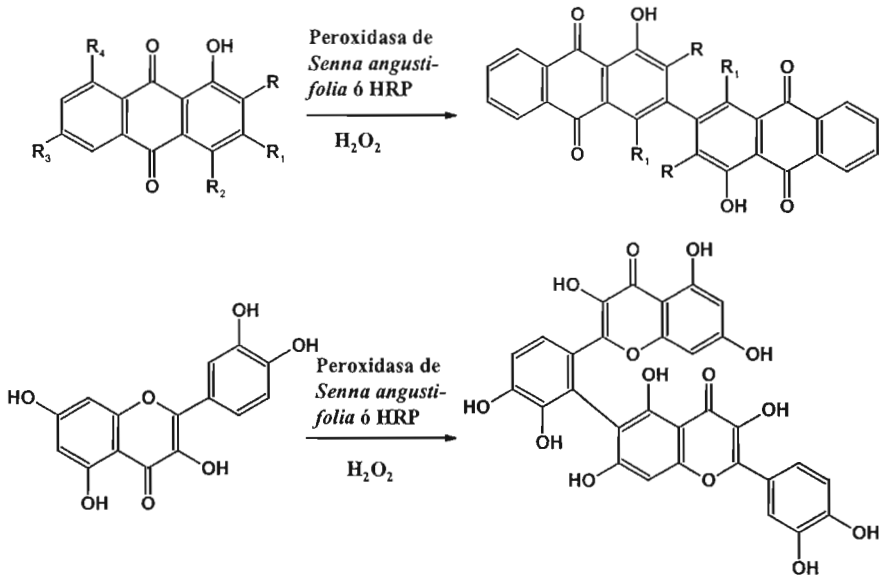
Los valores reportados para la constante de formación del compuesto II (k_3) son del orden de $2.80 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la HRP y el alcohol coniferil a pH 4,5 y $2.4 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para las peroxidasas de *Vitis vinifera* a pH 3.96.¹³ Los valores obtenidos para el presente trabajo son de $19.2 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la peroxidasa de *Senna angustifolia* y quercetina. Estos resultados ilustran la gran reactividad y plasticidad metabólica para la oxidación de sustratos fenólicos polihidroxilados del tipo de los flavonoides con respecto a los mejores sustratos para la reducción del compuesto II, como lo es el alcohol coniferil.

CONCLUSIONES

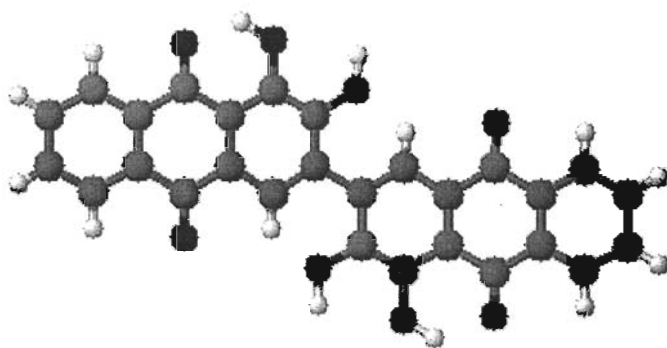
CONCLUSIONES

1. SE AISLO LA PEROXIDASA DE *S. Angustifolia*.
2. LA ALIZARINA Y PURPURINA FUERON LOS MEJORES SUBSTRATOS PARA LA PEROXIDASA DE *S. Angustifolia* Y LA HRP.
3. LOS PRODUCTOS PRINCIPALES DE ESTAS BIOTRANSFORMACIONES FUERON LOS DIMEROS: 3,3'-BIALIZARINA Y UN DIMERO NUEVO 3,3'-BIPURPURINA.
4. PARA OTRAS ANTRAQUINONAS, EL DIMERO SE OBTUVO A PARTIR DE LA RESPECTIVA ANTRACENONA.
5. PARA LOS DIMEROS DERIVADOS DE LAS ANTRACENONAS, SE OBSERVA LA PRESENCIA DE UN INTEMEDIARIO QUE DA ORIGEN A LA BIANTRAQUINONA.
6. ESTOS RESULTADOS DEMUESTRAN QUE LAS PEROXIDASAS PUEDEN TENER UNA PARTICIPACION EN LA BIOGENESIS DE LOS DIMEROS DE ANTRAQUINONAS EN LAS PLANTAS.
7. LOS VALORES DE $K_{m,app}$ y V_{max} PARA ALIZARINA Y PURPURINA FUERON 97 y 95 mM, Y 1.5 y 2.1 $mM \cdot min^{-1} \cdot mgprot^{-1}$, RESPECTIVAMENTE.
8. EL FLAVONOIDE QUERCETINA FUE USADO COMO SUBSTRATO EFICIENTEMENTE POR LA PEROXIDASA DE *S. Angustifolia* Y POR LA HRP, OBTENIENDO COMO PRODUCTO MAYORITARIO EL NUEVO DIMERO 2',6''-BIQUERCETINA
9. SE DETERMINARON LAS CONSTANTES CINETICAS k_1 y k_3 : 1 $mM^{-1}s^{-1}$ y 8.6 $mM^{-1}s^{-1}$ PARA EL GUAYACOL Y 3.1 $mM^{-1}s^{-1}$ y 19.2 $mM^{-1}s^{-1}$ PARA LA QUERCETINA.

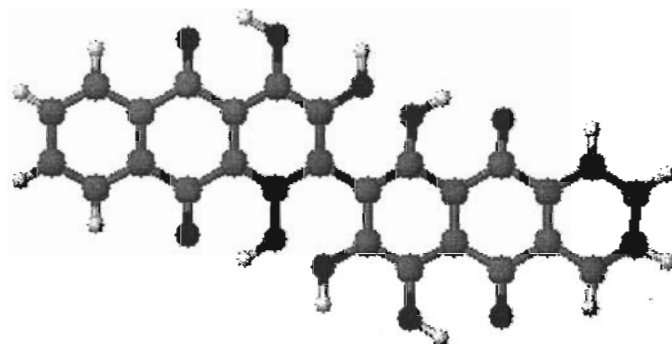
REACCION GENERAL DE LAS ANTRAQUINONAS CON LAS PEROXIDASAS



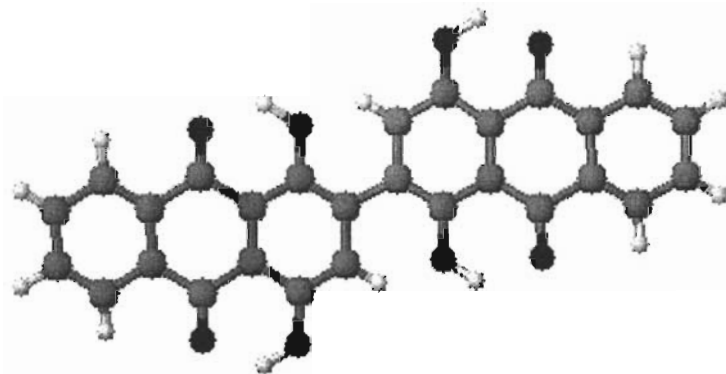
REPRESENTACION TRIDIMENSIONAL DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS EN LA REACCION DE LAS PEROXIDASAS CON LAS ANTRASQUINONAS Y LA QUERCETINA.



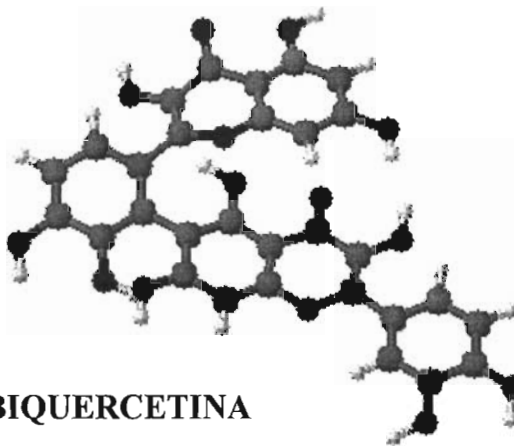
1,1',2,2'-cuatrihidroxi[3,3'-biantracén]-9,9',10,10'-tetrona
(3,3'-bializarina)



1,1',2,2',4,4'-hexahidroxi[3,3'-biantracén]-9,9',10,10'-tetrona
(3,3'-purpurina)



**1,1',4,4'-cuatrihidroxi[3,3'-biantracén]-9,9',10,10'-tetrona
(3,3'-biquinizarin)**



2',6'-BIQUERCETINA

BIBLIOGRAFIA

- (1) Lemli, J. *Fitoterapia* **1986**, *42*, 33-40.
- (2) Stoll, A.; Becher, B.; Kussmaul, W. Partialsynthese Von Alkaloiden Vom Typus Des Ergobasins (6. Mitteilung Uber Mutterkorn-Alkaloide). *Helv. chim. Acta* **1942**, *32*, 1892.
- (3) Lemli, J.; Dequeker, R.; Cuveele, J. *Pharm. Acta Helv.* **1971**, *46*, 179.
- (4) Kitanaka, S.; Takido, M. Dimeric Hydroanthracenes From the Unripe Seeds of *Cassia Torosa*. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 2103-2106.
- (5) Alemayehu, G.; Abegaz, B.; Snatzke, G.; Duddeck, H. Bianthraquinones and a Spermidine Alkaloid From *Cassia Floribunda*. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 3255-3258.
- (6) Alemayehu, G.; Abegaz, B.; Snatzke, G.; Duddeck, H. Bianthrones From *Senna Longiracemosa*. *Phytochemistry* **1993**, *32*, 1273-1277.
- (7) Alemayehu, G.; Hailu, A.; Abegaz, B. Bianthraquinones From *Senna Didymobotrya*. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1423-1425.
- (8) Goodman, G. A.; Rall, T. W. Las Bases Farmacológicas De La Terapéutica; Editorial Panamericana: 1991.
- (9) Qhotsokoane-Lusunzi, M. A.; Karuso, P. Secondary Metabolites From Basotho Medicinal Plants. I. *Bulbine Narcissifolia*. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1368-1372.
- (10) Kraus, G. A.; Pratt, D.; Tossberg, J.; Carpenter, S. Antiretroviral Activity of Synthetic Hypericin and Related Analogs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *172*, 149-153.
- (11) Barnard, D. L.; Fairbairn, D. W.; O'Neill, K. L.; Gage, T. L.; Sidwell, R. W. Sulfonated Anthraquinones As Inhibitors of HCMV Replication. *Antiviral Res.* **1995**, *28*, 317-329.
- (12) Schinazi, R. F.; Chu, C. K.; Babu, J. R.; Oswald, B. J.; Saalman, V.; Cannon, D. L.; Eriksson, B. F.; Nasr, M. Anthraquinones As a New Class of Antiviral Agents Against Human Immunodeficiency Virus. *Antiviral Res.* **1990**, *13*, 265-272.
- (13) Barnard, D. L.; Huffman, J. H.; Morris, J. L.; Wood, S. G.; Sidwell, R. W. Evaluation of the Antiviral Activity of Anthraquinones, Anthrones and Anthraquinone Against Human Cytomegalovirus. *Antiviral Res.* **1992**, *17*, 63-77.
- (14) Sydskis, R. J.; Owen, D. G.; Lohr, J. L.; Rosler, K. H.; Blomster, R. N. Inactivation of Enveloped Viruses by Anthraquinones Extracted From Plants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, *35*, 2463-2466.
- (15) Takahashi, I.; Nakanishi, S.; Kobayashi, E.; Nakano, H.; Susuki, K.; Tamaoki, T. Hypericin and Pseudohypericin Specifically Inhibit Protein Kinase C: Possible

- Relation to Their Antiretroviral Activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *165*, 1207-1212.
- (16) Lavie, G.; Valentine, F.; Levin, B.; Mazur, Y.; Gallo, G.; Lavie, D.; Weiner, D. Studies of the Mechanisms of Action of the Antiretroviral Agents Hypericin and Pseudohypericin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 5963-5967.
 - (17) Lin, Y. M.; Anderson, H.; Flavin, M. T.; Pai, Y. H. S.; Mata-Greenwood, E.; Pengsuparp, T.; Pezzuto, J. M.; Schinazi, R. F.; Hughes, S. H.; Chen, F. Ch. In Vitro Anti-HIV Activity of Biflavonoids Isolated From *Rhus Succedanea* and *Garcinia Multiflora*. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 884-888.
 - (18) Wu, Ch. H.; Hsieh, Ch. L.; Song, T. Z.; Yen, G. C. Inhibitory Effects of *Cassia Tora* L. on Benzo[a]Pyrene-Mediated DNA Damage Toward HepG2 Cells. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *49*, 2579-2586.
 - (19) Wu, Ch. H.; Yen, G. C. Antigenotoxic Properties of *Cassia* Tea (*Cassia Tora* L.): Mechanism of Action and the Influence of Roasting Process. *Life Sciences* **2004**, *76*, 85-101.
 - (20) Hussein, A. A.; Bozzi, B.; Correa, M.; Capson, T. L.; Kursar, T. A.; Coley, P. D.; Solis, P. N.; Gupta, M. P. Bioactive Constituents From Three *Vismia* Species. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 858-860.
 - (21) Koyama, J.; Morita, I.; Tagahara, K.; Aqil, M. Bianthraquinones From *Cassia Siamea*. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 849-851.
 - (22) Koyama, J.; Morita, I.; Kobayashi, N.; Osakai, T.; Nishino, H.; Tokuda, H. Correlation of Redox Potentials and Inhibitory Effects on Epstein-Barr Virus Activation of 2-Azaanthraquinones. *Cancer Letters* **2004**, *212*, 1-6.
 - (23) Koyama, J.; Morita, I.; Tagahara, K.; Ogata, M.; Mukainaka, T.; Tokuda, H.; Nishino, H. Inhibitory Effects of Anthraquinones and Bianthraquinones on Epstein-Barr Virus Activation. *Cancer Letters* **2001**, *2001*, 15-18.
 - (24) Yang, J.; Li, H.; Chen, Y. Y.; Wang, X. J.; Shi, G. Y.; Hu, Q. S.; Kang, X. L.; Lu, Y.; Tang, X. M.; Guo, Q. S.; Yi, J. Anthraquinones Sensitize Tumor Cells to Arsenic Cytotoxicity in Vitro and in Vivo Via Reactive Oxygen Species-Mediated Dual Regulation of Apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* **2004**, *37*, 2027-2041.
 - (25) Thomson, R. H. Naturally Occurring Quinones; Academic Press: New York, 1957.
 - (26) Thomson, R. H. Naturally Occurring Quinones III: Recent Advances; Chapman and Hall: London, New York, 1987.
 - (27) Chen, Z. G.; Fujii, I.; Ebizuka, Y.; Sankawa, U. Purification and Characterization of Emodinanthrone Oxygenase From *Aspergillus Terreus*. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 299-305.

- (28) Anderson, J. A.; Lin, B. K.; Wang, S. S. Purification and Properties of Emodin Deoxygenase From *Pyrenochaeta Terrestris*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2415-2418.
- (29) Anderson, J. A.; Lin, B. K. NADPD Isotope Effect on Activity of Emodin Deoxygenase. *Phytochemistry* **1993**, *32*, 811-812.
- (30) Ohnishi, K.; Suemitsu, R.; Kubota, M.; Matano, H.; Yamada, Y. Biosyntheses of Alterporriol D and E by *Alternaria Porri*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2593-2595.
- (31) Okamura, N.; Haraguchi, H.; Hashimoto, K.; Yagi, A. Altersolanol-Related Antimicrobial Compounds From a Strain of *Alternaria Solani*. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 1005-1009.
- (32) Steglich, W.; Oertel, B. *Sydowia* **2005**, *37*, 284.
- (33) Gill, M.; Steglich, W. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* **1987**, *51*, 1.
- (34) Gill, M. Pigments of Fungi (Macromycetes). *Natural Product Reports* **1994**, *11*, 67-90.
- (35) Domínguez, X. A. Métodos De Investigación Fitoquímica; 1973.
- (36) Harborne, J. B. *Phytochemical Methods: a Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*; Chapman and Hall: London, New York, 1984.
- (37) Trease, G. E.; Evans, W. C. *Tratado De Farmacognosia*; Editorial Interamericana: Mexico, 1986.
- (38) Mukherjee, K. S.; Bhattacharjee, P.; Mukherjee, R. K.; Ghosh, P. K. *J. Indian Chem. Soc.* **1987**, *44*, 130.
- (39) Erni, F.; Frei, W. Two-Dimensional Column Liquid Chromatographic Technique for Resolution of Complex Mixtures. *J. Chromatogr.* **1978**, *149*, 561-569.
- (40) Ohshima, Y.; Takahashi, K. Separation Method for Sennosides. *J. Chromatogr.* **1983**, *258*, 292-296.
- (41) Srivastava, V. K.; Maheshwari, M. L.; Mandal, S. *Ind. J. Pharm. Sci.* **1983**, *45*, 230-233.
- (42) Hayashi, S.; Yoshida, A.; Tanaka, H.; Mitani, Y.; Yoshizawa, K. Analytical Studies on the Active Constituents in Crude Drugs. IV. Determination of *Sennosides* in Senna and Formulations by High-Performance Liquid Chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 406-412.
- (43) Komolafe, O. O. J. High-Pressure Liquid Chromatographic Analysis of *Sennosides* A and B Purgative Drugs. *J. Pharm. Sci.* **1981**, *70*, 727-730.

- (44) Verma, R. K.; Unilay, G. C.; Singh, S. P.; Sharma, J. R.; Gupta, M. M. Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography of Sennosides in *Cassia Angustifolia*. *Phytochemical Analysis* **1996**, *7*, 73-75.
- (45) Metzger, W.; Reif, K. Determination of 1,8-Dihydroxyanthranoids in Senna. *J. Chromatogr.* **1996**, *740*, 133-138.
- (46) Seibl, J.; Calderon, J.; Stud, M. Espectrometría De Masas; Edit. Alhambra: España, 1973; pp 19-43.
- (47) Hayashi, K.; Hayashi, T.; Morita, N. Mechanism of Action of the Antiherpesvirus Biflavone Ginkgetin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 1890-1893.
- (48) Anand, K. K.; Gupta, V. N.; Rangari, V.; Singh, B.; Chandan, B. K. *Planta Med.* **1992**, *58*, 493-495.
- (49) Chem.Abstr. 12[59], 2759a. 1941.
Ref Type: Abstract
- (50) Geiger, H.; Quinn, C. The Flavonoids Advances in Research; Chapman and Hall: London, New York, 1982; pp 505-534.
- (51) Vlietinck, A. J.; De-Bruyne, T.; Aspers, S.; Pieters, L. A. Plant-Derived Leading Compounds for Chemotherapy of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection. *Planta Med.* **1998**, *64*, 97-102.
- (52) Lin, Y. M.; Flavin, M. T.; Schure, R.; Chen, F. Ch.; Sidwell, R.; Barnard, D. L.; Huffman, J. H.; Kern, E. R. Antiviral Activities of Biflavonoids. *Planta Med.* **1999**, *65*, 120-125.
- (53) Lin, Y. M.; Flavin, M. T.; Cassidy, C. S.; Mar, A.; Chen, F. C. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2001**, *11*, 2101-2104.
- (54) Ito, Ch.; Itoigawa, M.; Miyamoto, Y.; Rao, K. S.; Takayasu, J.; Okuda, Y.; Mukainaka, T.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Furukawa, H. J. A New Biflavonoid From *Calophyllum Panicflorum* With Antitumor-Promoting Activity. *J. Natural Products* **1999**, *62*, 1668-1671.
- (55) Botta, B.; Vinciguerra, V.; De Rosa, M. C.; Scurria, R.; Carbonetti, A.; Ferrari, F.; Monache, G. D.; Misiti, D. Studies in Cell Suspension Cultures of *Cassia Didymobotrya*: Part III. The Biotransformation of Chalcones to Flavones and Biflavanones. *Heterocycles* **1989**, *29*, 2175-2183.
- (56) Vitali, A.; Botta, B.; Delle, M. G.; Zappitelli, S.; Ricciardi, P.; Melino, S.; Petruzzelli, R.; Giardina, B. Purification and Partial Characterization of a Peroxidase From Plant Cell Cultures of *Cassia Didymobotrya* and Biotransformation Studies. *Biochem. J.* **1998**, *331*, 513-519.
- (57) Dunford, H. B. Peroxidase in Chemistry and Biology; CRC Press: Boca Raton, FL, 1991.

- (58) Gaspar, T.; Penel, C.; Thorpe, T.; Greppin, H. Peroxidase 1970-1980: a Survey of Their Biochemicals and Physiological Roles in Higher Plants; University of Geneva Press: Geneva, Switzerland, 1982; pp 1.
- (59) Liyama, K.; Lam, T. B. T.; Meikle, P. J.; Ng, K.; Rhodes, D. J.; Stone, B. A. Forage Cell Wall Structure and Digestibility; American society of Agronomy: 1993; pp 621.
- (60) Hammerchmidt, R.; Nuckles, E.; Kuc, J. *Physiol. Plant Pathol.* **1982**, *20*, 73-82.
- (61) Kolattukudy, P. E.; Mohan, R.; Bajar, A. A.; Schef, B. A. *Biochem. Soc. Trans.* **1992**, *20*, 333-337.
- (62) Bradley, D. J.; Kjellbom, P.; Lamb, C. J. *Cell* **1992**, *70*, 21-30.
- (63) Gross, G. G. *Adv. Bot. Res.* **1980**, *8*, 25-26.
- (64) Mäder, M.; Nessel, A.; Scholss, P. Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases; University of Geneva: Geneva, 1986; pp 247.
- (65) Pomar, F.; Bernal, M. A.; Diaz, J.; Merino, F. Purification, Characterization and Kinetic Properties of Pepper Fruit Acidic Peroxidase. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 1313-1317.
- (66) Bruun, Ch.; Dunford, H. B.; Welinder, K. G. Rate Enhancement of Compound I Formation of Barley Peroxidase by Ferulic Acid, Caffeic Acid and Coniferyl Alcohol. *Biochemistry* **1995**, *34*, 4022-4029.
- (67) Rasmussen, C. B.; Dunford, H. B.; Welinder, K. G. Rate Enhancement of Compound I Formation of Barley Peroxidase by Ferulic Acid, Caffeic Acid, and Coniferyl Alcohol. *Biochemistry* **1995**, *34*, 4022-4029.
- (68) Zapata, J. M.; Calderón, A. A.; Muñoz, R.; Ros Barceló, A. Oxidation of Hydroquinone by Both Cellular and Extracellular Grapevine Peroxidase Fractions. *Biochimie* **1992**, *74*, 143.
- (69) Mayer, A. M.; Harel, E. Polyphenol Oxidases in Plants. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 193-215.
- (70) Mayer, A. M. Polyphenol Oxidases in Plants-Recent Progress. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 11-20.
- (71) Dean, J. F. D.; LaFayette, P. R.; Rugh, C.; Tristram, A. H.; Hoopes, J. T.; Eriksson, K. E. L. Laccases Associated With Lignifying Vascular Tissues. Lignin and Lignan Biosynthesis; American Chemical society: Washintong D. C., 1998; pp 96.
- (72) Sterjiades, R.; Dean, J. F. D.; Eriksson, K. E. L. *Plant Physiol.* **1992**, *99*, 1162-1168.
- (73) Mayer, A. M.; Staples, R. C. Laccase: New Functions for an Old Enzyme. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 551-565.

- (74) Bourbonnais, R.; Paice, M. G. Oxidation of Non-Phenolic Substrates An Expanded Role for Laccase in Lignin Biodegradation . *FEBS Letters* **1990**, *267*, 99-102.
- (75) Kawai, S.; Asukai, M.; Ohya, N.; Okita, K.; Ito, T.; Ohashi, H. *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, *170*, 51-57.
- (76) Kawai, S.; Nakagawa, M.; Ohashi, H. *FEBS Letters* **1999**, *446*, 355-358.
- (77) Majcherczyk, A.; Johannes, C.; Huttermann, A. *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *22*, 335-341.
- (78) Pickard, M. A.; Roman, R.; Tinoco, R.; Vazquez-Duhalt, R. *Appl. environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 3805-3809.
- (79) Johannes, C.; Majcherczyk, A.; Huttermann, A. *Appl. Microb. Biotechnol.* **1996**, *46*, 313-317.
- (80) Okazaki, S.; Michioze, J.; Goto, M.; Furusaki, S.; Wariishi, H.; Tanaka, H. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 227-232.
- (81) Solomon, E. I.; Baldwin, M. J.; Lowery, M. D. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 521.
- (82) Solomon, E. I.; Lowery, M. D. *Science* **1993**, *259*, 1575.
- (83) Burton, S. G. Biocatalysis With Polyphenol Oxidase: a Review. *Catalysis Today* **1994**, *22*, 459-487.
- (84) Thurston, C. F. *Microbiology* **1994**, *140*, 19-26.
- (85) Yaropolov, A. I.; Skirobogatkko, O. V.; Vatanov, S. S.; Varfolomeyev, S. D. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1994**, *49*, 257-280.
- (86) Rittsieg, K.; Suurnakki, A.; Suortti, T.; Kruus, K.; Guebitz, G.; Buchert, J. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 403-410.
- (87) Bourbonnais, R.; Paice, M. G. Demethylation and Delignification of Kraft Pulp by *Trametes Versicolor* Laccase in the Presence of 2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulphonate). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *36*, 823-827.
- (88) Bourbonnais, R.; Paice, M. G.; Freiermuth, B.; Bodie, E.; Bornerman, S. Reactivities of Various Mediators and Laccases With Kraft Pulp and Lignin Model Compounds. *Appl. environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 4627-4632.
- (89) Hammel, K. E.; Moen, M. A. *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, *13*, 15-18.
- (90) Eggert, C.; Temp, U.; Dean, J. F. D.; Eriksson, K. E. L. A Fungal Metabolite Mediates Degradation of Non-Phenolic Lignin Structures and Synthetic Lignin by Laccase. *FEBS Letters* **1996**, *391*, 144-148.

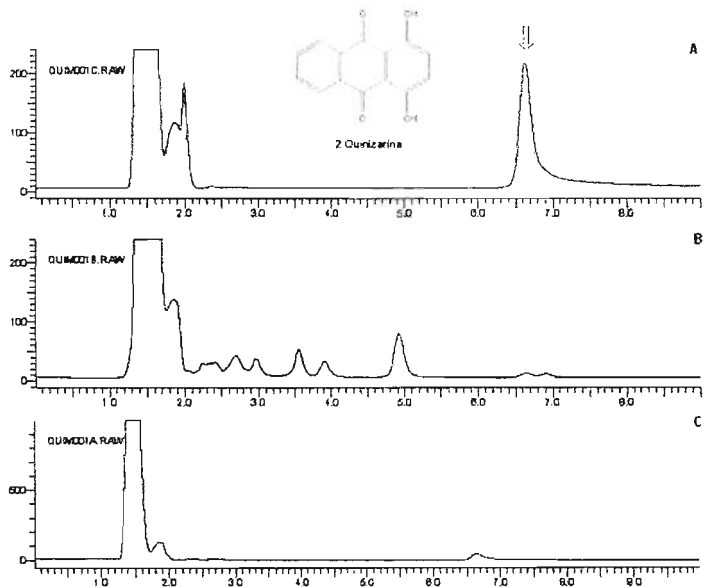
- (91) Fabbrini, M.; Galli, C.; Gentili, P. Comparing the Efficiency of Some Mediators of Laccase. *J. Mol. Catal. B: Enz.* **2002**, *16*, 231-240.
- (92) Zhi-wei, G.; Grzregorz, M.; Salamnonczyk, K. H.; Koji, M. Enzymatic Oxidative Phenolic Coupling. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6700-6701.
- (93) Brown, B. R. Oxidative Coupling of Phenols; W. I. Taylor INC.: New York, 1967; pp 167.
- (94) Smith, M. B. Organic Synthesis; McGraw-Hill International Editions: 1994.
- (95) Tomita, M.; Fujitani, K.; Aoyagi, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1965**, *13*, 1341-1345.
- (96) Boger, D. L.; Yohannes, D. Total Synthesis of K-13. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2498-2502.
- (97) Boger, D. L.; Yohannes, D. Total Synthesis of L,L-Isodityrosine and Isodityrosine-Derived Agents: K-13, OF4949-III, and OF4949-IV. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 6000-6017.
- (98) Fanta, P. E. *Chem. Rev.* **1964**, *64*, 613.
- (99) Olah, E. G. Friedel-Crafts and Related Reactions; Interscience: New York, 1964.
- (100) March, J. Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanism and Structure; McGraw-Hill: New York, 1968; pp 253.
- (101) Hoffman, R. W. Dehydrobenzene and Cyclic Alkynes; Academic Press: New York, NY, 1967; pp 106-108.
- (102) McKillop, A.; Elsom, L. F.; Taylor, E. C. Thallium in Organic Synthesis—XVII Preparation of Biaryls From Arylmagnesium Bromides and Thallium(I) Bromide. *Tetrahedron* **1970**, *26*, 4041-4050.
- (103) House, H. O.; Koepsell, D.; Jaeger, W. Derivatives of 1,8-Diphenylanthracene. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 1167-1173.
- (104) Whiteside, G. M.; Fischer, W. F.; San Filippo, J.; Bashe, R. W.; House, H. O. Thallium in Organic Synthesis. 58. Regiospecific Intermolecular Oxidative Dehydrodimerization of Aromatic Compounds to Biaryls Using Thallium(III) Trifluoroacetate. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6504-6512.
- (105) McKillop, A.; Turrel, A. G.; Young, D. W.; Taylor, E. C. Thallium in Organic Synthesis. 58. Regiospecific Intermolecular Oxidative Dehydrodimerization of Aromatic Compounds to Biaryls Using Thallium(III) Trifluoroacetate. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6504-6512.
- (106) Prinz, H.; Wiegrebe, W.; Müller, K. Syntheses of Anthracenones. 1. Sodium Dithionite Reduction of *Peri*-Substituted Anthracenediones. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2853-2856.

- (107) Arrieta-Baez, D.; Roman, R.; Vazquez-Duhalt, R.; Jiménez-Estrada, M. Peroxidase-Mediated Transformation of Hydroxy-9,10-Anthraquinones. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 567-572.
- (108) Laatsch, H. Synthese Dimerer Und Cyclo-Trimerer 1,4-Anthrachinone. *Liebigs Annales of Chemie* **1986**, 839-858.
- (109) Johannes, C.; Majcherczyk, A. *Appl. environ. Microbiol.* **200**, *66*, 524-528.
- (110) Bourbonnais, R.; Paice, M. G.; Reid, I. D.; Lanthier, P.; Yaguchi, M. Lignin Oxidation by Laccase Isozymes From *Trametes Versicolor* and Role of the Mediator 2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) in Kraft Lignin Depolymerization. *Appl. environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 1876-1880.
- (111) Call, H. P.; Mücke, I. History, Overview and Applications of Mediated Lignolytic Systems, Especially Laccase-Mediator-Systems (Lignozym®-Process). *J. Biotechnol.* **1997**, *53*, 163-202.
- (112) Fritz-Langhals, E.; Kunath, B. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5955-5956.
- (113) Potthast, A.; Rosenau, T.; Chen, L.; Gratzl, J. S. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4320-4321.
- (114) Chandra, R. P.; Ragauskas, A. *J. Enz. Microbiol. Technol.* **2002**, *30*, 855-861.
- (115) Collins, P. J.; Kotterman, M. J.; Field, J. A.; Dobson, A. D. Oxidation of Anthracene and Benzo[a]Pyrene by Laccases From *Trametes Versicolor*. *Appl. environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 4563-4567.
- (116) Johannes, C.; Majcherczyk, A.; Huttermann, A. *Appl. Microb. Biotechnol.* **1996**, *43*, 313-317.
- (117) Majcherczyk, A.; Johannes, C.; Huttermann, A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 267-276.
- (118) Sang, S.; Cheng, X.; Stark, R. E.; Rosen, R. T.; Yang, Ch. S.; Ho, Ch. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2233-2237.
- (119) Bamminger, U.; Ludwig, R.; Galhaup, Ch.; Leither, Ch.; Kulbe, K. D.; Haltrich, D. Continuous Enzymatic Regeneration of Redox Mediators Used in Biotransformation Reactions Employing Flavoproteins. *J. Mol. Catal. B: Enz.* **2001**, *11*, 541-550.
- (120) Middleton, E. The Flavonoids: Advances in Research From 1986. The Impact of Plant Flavonoids on the Mammalian Biology: Implications for Immunity, Inflammation and Cancer.; Chapman and Hall: New York, 2000; pp 619-652.
- (121) Bolton, J. L.; Pisha, E.; Zhang, F.; Qiu, S. Role of Quinoids in Estrogen Carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 1113-1126.
- (122) Penning, T. M.; Burczynski, M. E.; Hung, C. F.; McCoull, K. D.; Palackal, N. T.; Tsuruda, S. L. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 1-18.

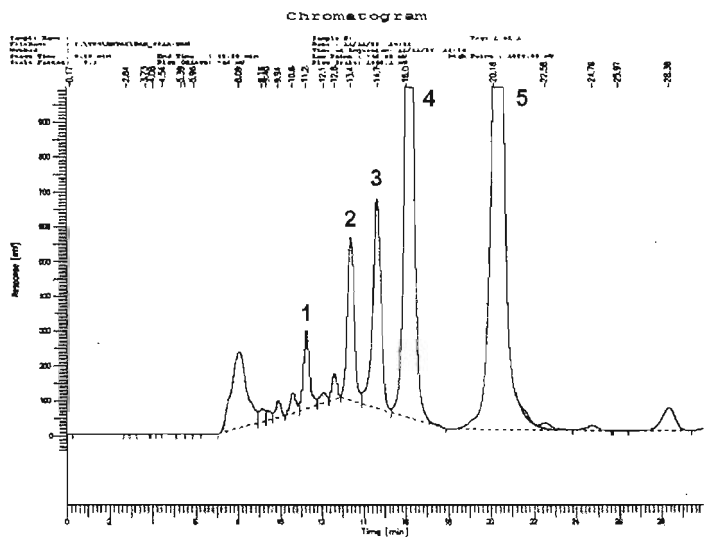
- (123) Miller, E.; Eschreier, P. *Food Chem.* **1985**, *17*, 143-154.
- (124) Eschreier, P.; Miller, E. *Food Chem.* **1985**, *18*, 301-317.
- (125) Takahama, U. *Plant Cell Physiol.* **1987**, *28*, 953-957.
- (126) Awad, H. M.; Boersma, M. G.; Vervoot, J.; Rietjens, I. M. C. M. Peroxidase-Catalyzed Formation of Quercetin Quinone Methide–Glutathione Adducts. *Arch. Biochem. and Biophys.* **200**, *378*, 224-233.
- (127) Barz, W. *Physiol. Veg.* **1977**, *15*, 261-277.
- (128) Hosny, M.; Rosazza, J. P. N. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5539-5545.

APENDICES

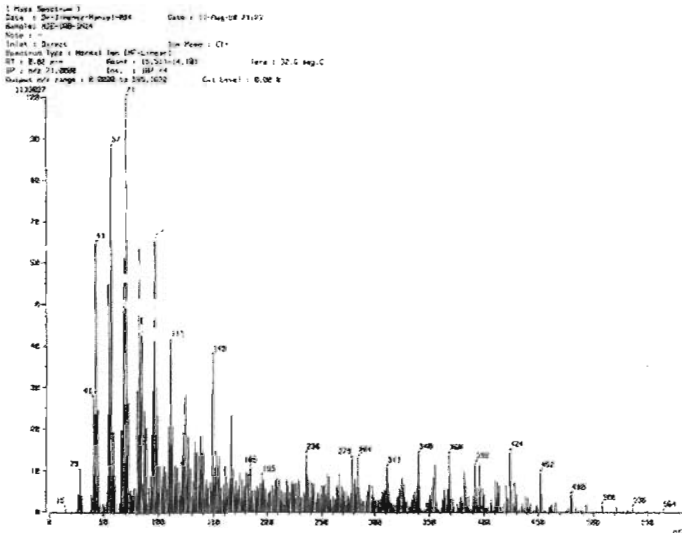
**CROMATOGRAMAS Y ESPECTROS DE MASAS DE LA
CONVERSION DE ANTRAQUINONAS CON LACASA EN
PRESENCIA DEL MEDIADOR ABTS**



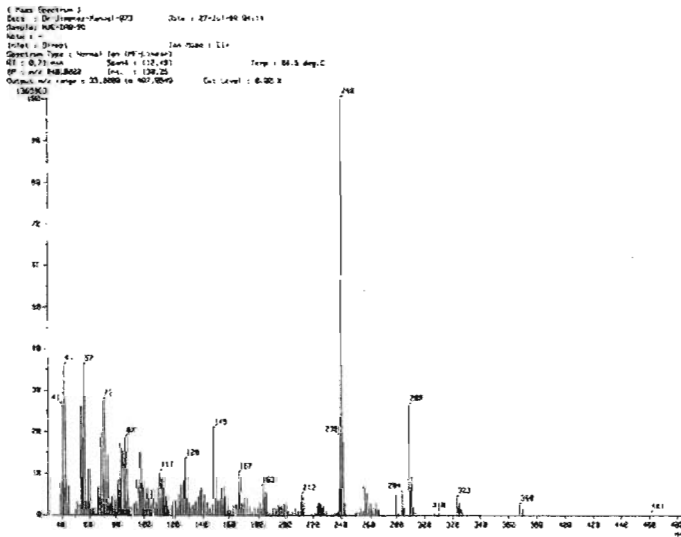
CROMATOGRAMA 1: Bioreacción de quizarina con la lacasa y ABTS A) Tiempo cero de reacción. B) 15 horas de reacción. C) Blanco de Lacasa con ABTS.



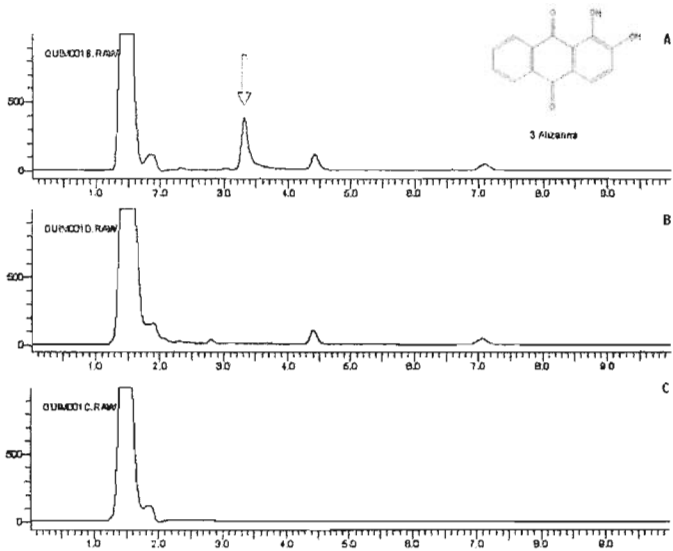
CROMATOGRAMA 2: Productos de la conversión de la lacasa y la quizarina en presencia del inductor ABTS.



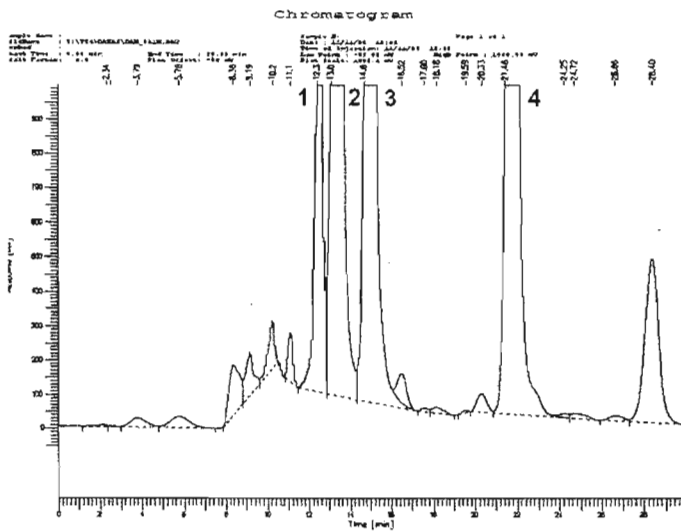
ESPECTRO DE MASAS de la fracción 4 de los productos aislados de la reacción de la lacasa con la quinizarina en presencia del inductor ABTS.



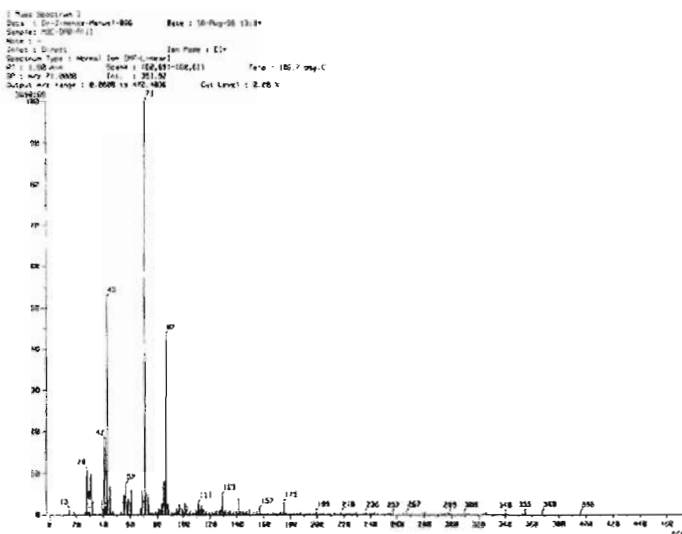
ESPECTRO DE MASAS de la fracción 5 de los productos aislados de la reacción de la lacasa con la quinizarina en presencia del inductor ABTS.



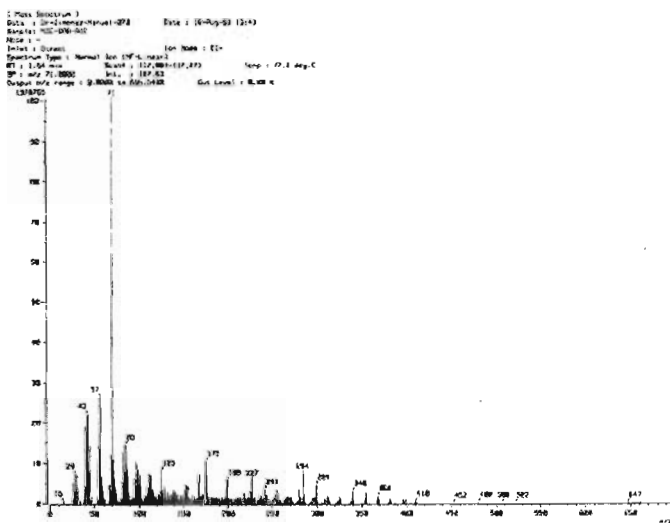
CROMATOGRAMA 3: Reacción de la alizarina con la lacasa y el ABTS A) Tiempo cero de reacción (el pico de la alizarina se indica con la flecha). B) 15 horas de reacción. C) Blanco de Lacasa con ABTS.



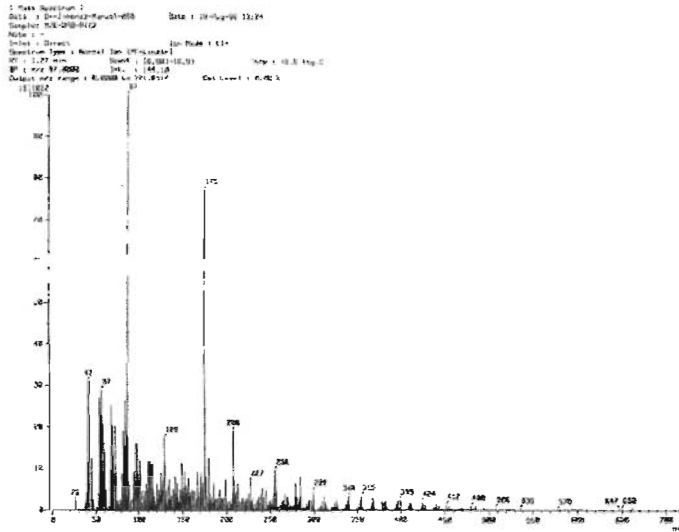
CROMATOGRAMA 4: Productos de la conversión de la lacasa con la quinizarina en presencia del inductor ABTS.



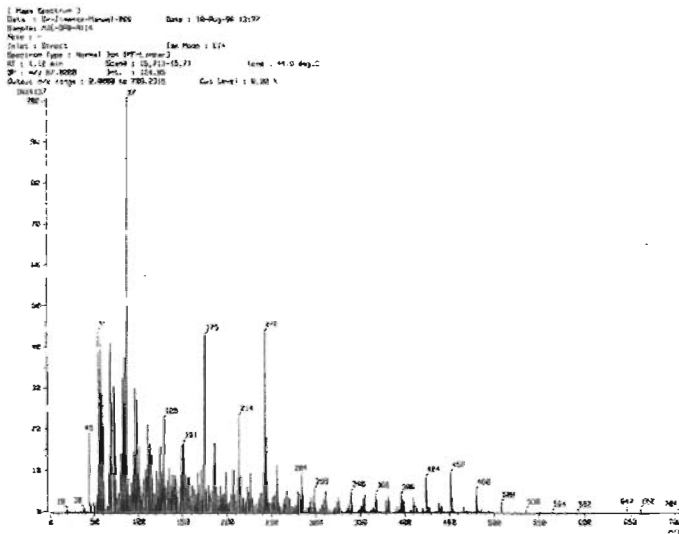
ESPECTRO DE MASAS de la fracción 1 de los productos aislados de la reacción de la lacasa con la alizarina en presencia del inductor ABTS.



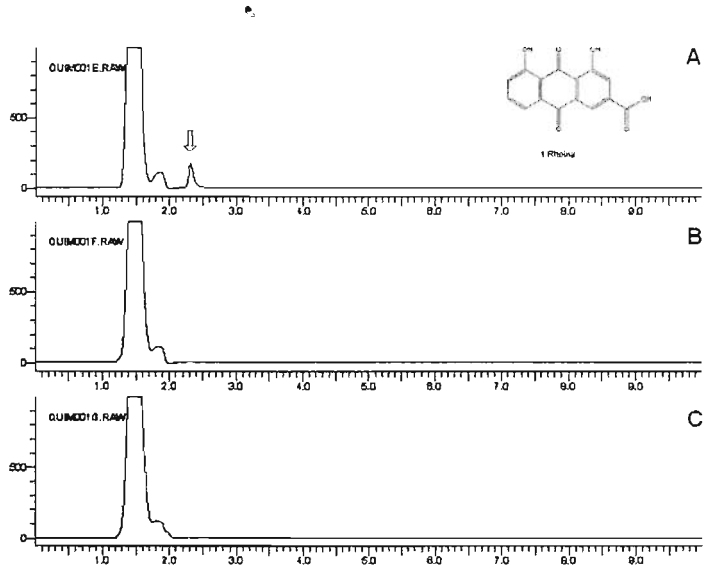
ESPECTRO DE MASAS de la fracción 2 de los productos aislados de la reacción de la lacasa con la alizarina en presencia del inductor ABTS.



ESPECTRO DE MASAS de la fracción 3 de los productos aislados de la reacción de la lacasa con la alizarina en presencia del inductor ABTS.

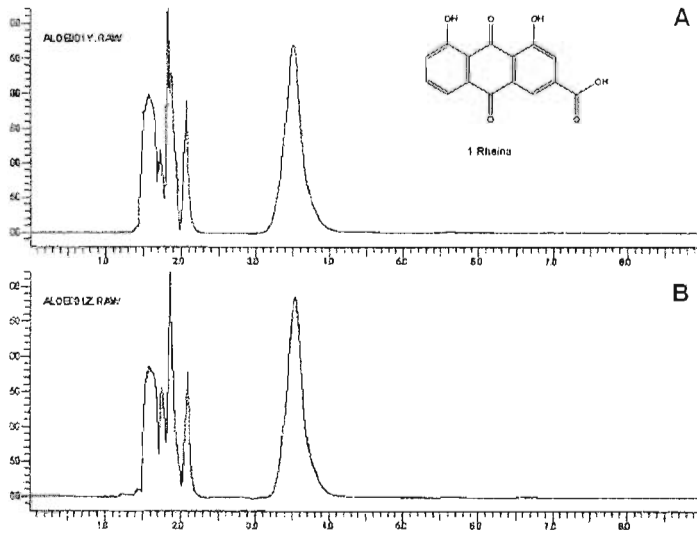


ESPECTRO DE MASAS de la fracción 4 de los productos aislados de la reacción de la lacasa con la alizarina en presencia del inductor ABTS.

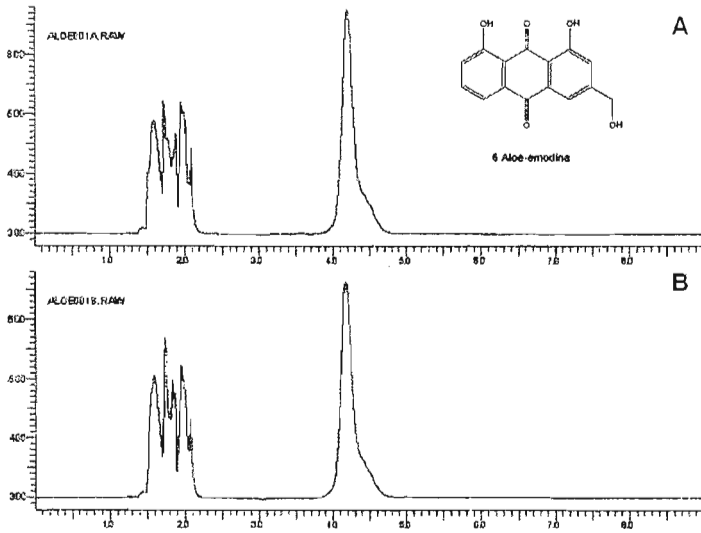


CROMATOGRAMA 5: Reacción de la rheina con la lacasa y el ABTS A) Tiempo cero de reacción (el pico del sustrato se indica con la flecha). B) 15 horas de reacción. C) Blanco de Lacasa con ABTS.

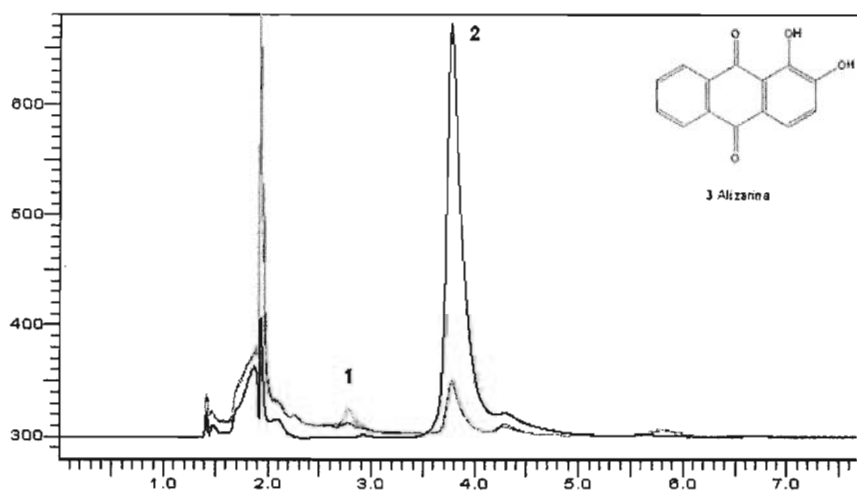
CROMATOGRAMAS Y ESPECTROS DE RMN Y MASAS DE LOS PRODUCTOS DE BIOCONVERSION DE ANTRAQUINONAS CON LAS PEROXIDASA DE *S. angustifolia* Y LA PEROXIDASAS DE RABANO PICANTE (HOSERADISH PEROXIDASE, HRP)



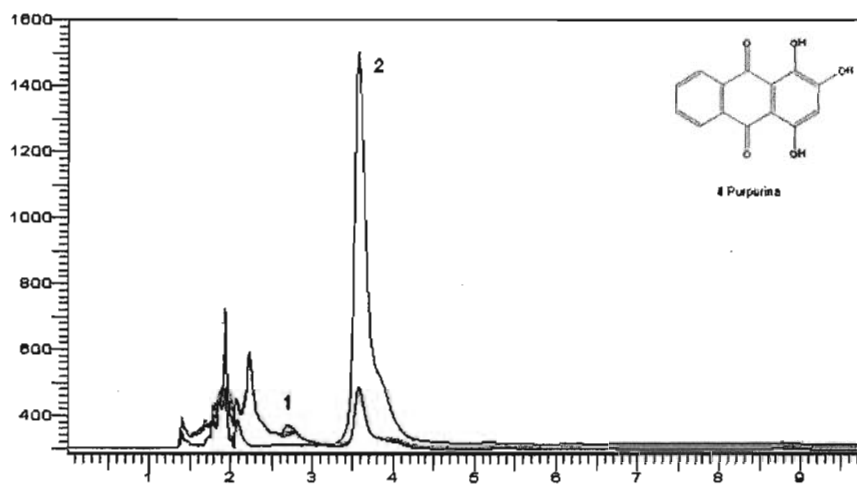
CROMATOGRAMA 6: Reacción de la rheina con la HRP: A) Tiempo cero de reacción. B) 30 minutos de reacción.



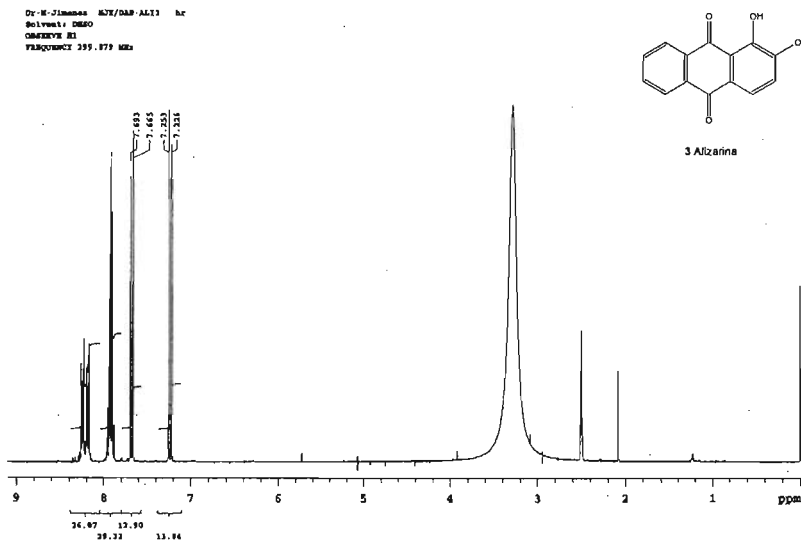
CROMATOGRAMA 7: Reacción de la aloe-emodina con la HRP: A) Tiempo cero de reacción. B) 30 minutos de reacción.



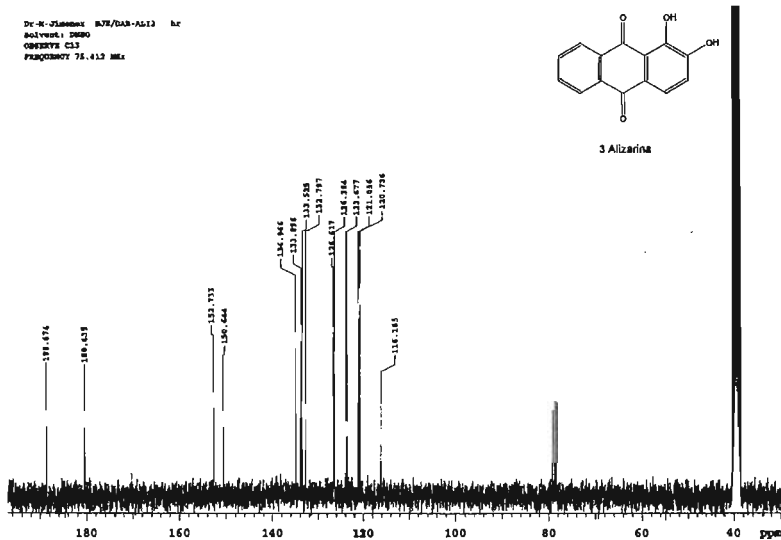
CROMATOGRAMA 8: Conversión de la alizarina con la HRP: 1) Productos de reacción. 2) Pico de la antraquinona alizarina.



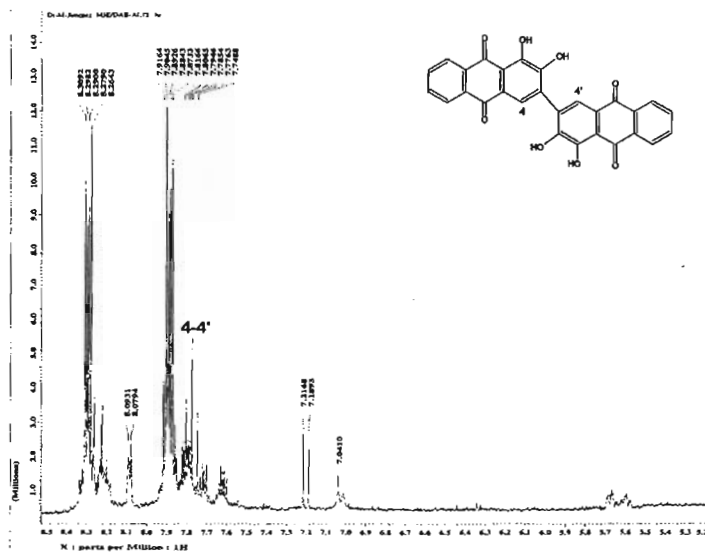
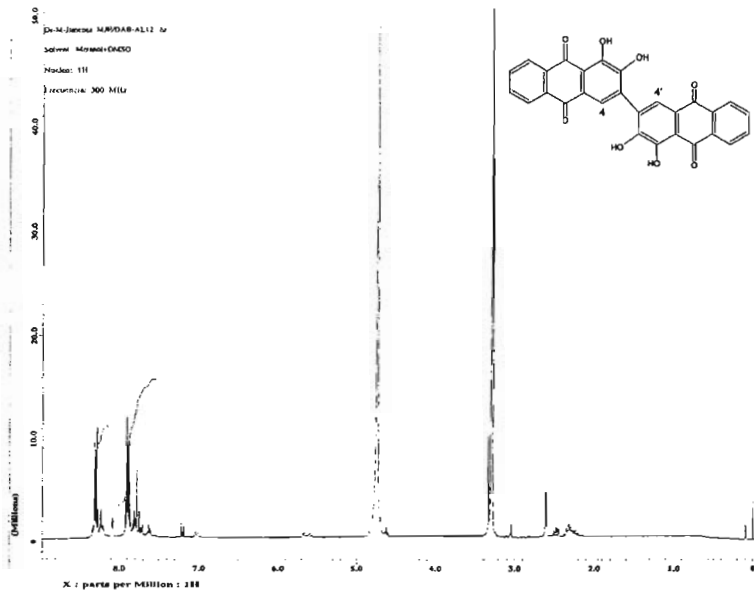
CROMATOGRAMA 9: Conversión de la purpurina con la HRP: 1) Productos de reacción. 2) Pico de la antraquinona purpurina.



ESPECTRO DE RMN-H DE ALIZARINA: Dobletes a δ 7.23 y 7.65 ppm para los protones 3 y 4 y un sistema AB para los protones 5,6,7 y 8.

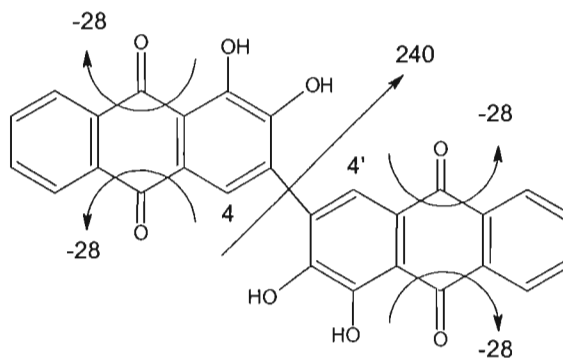
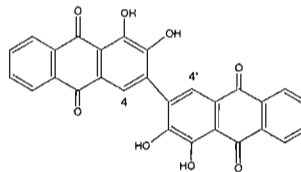
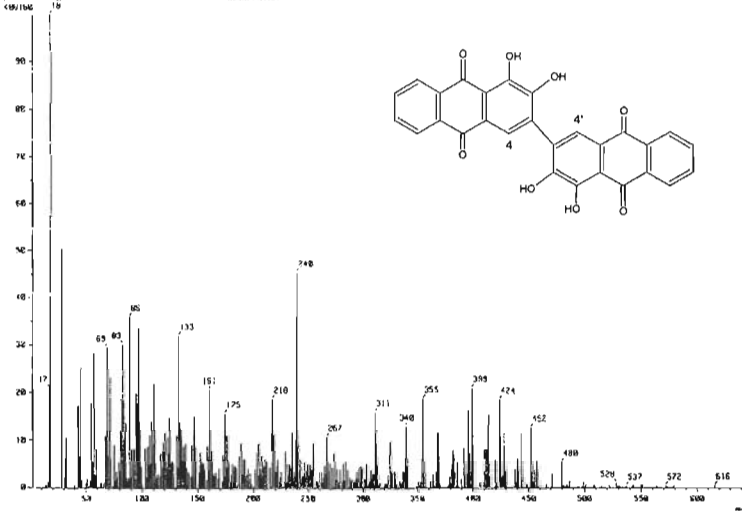


ESPECTRO DE RMN DE CARBON DE LA ANTRAQUINONA ALIZARINA.

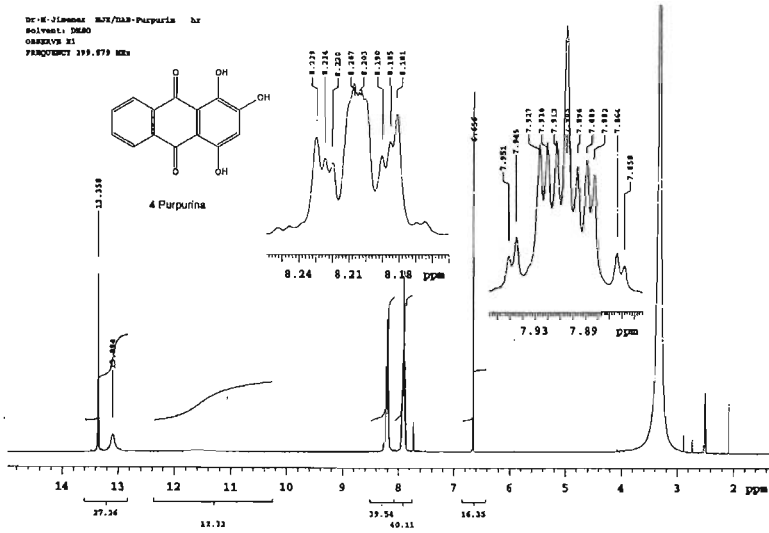


ESPECTRO DE RMN-H DE 3,3'-BIALIZARINA: sistema AB en 7.9 y 8.2 ppm, correspondientes a los protones 5,5',6,6',7,7' y 8,8' del dimero. Un singlete en 7.7 ppm correspondiente al H-4 y H-4'

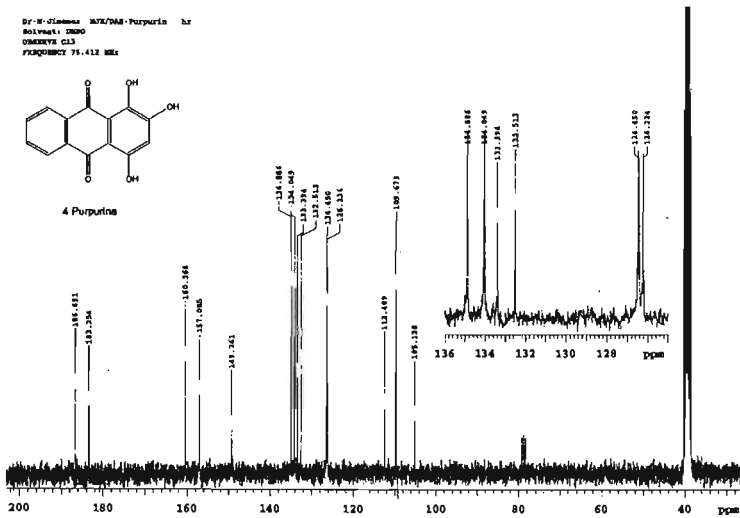
sample: 146-14600000.jax
 MS1A : -
 Inlet : Direct Ion Mode : CI+
 Spectrum Type : Normal Ion [F+Linear]
 RT : 1.23 min Scan# : (15,261-135,27) Temp : 73.4 deg.C
 SF : 10.00000 Int : 35.24
 Output file range : 4.7470 to 646.6843 Cut Level : 8.86 X
 (89)106



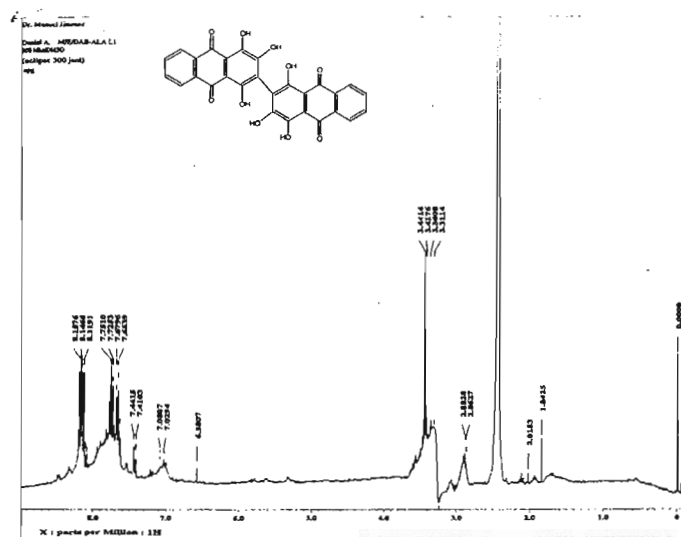
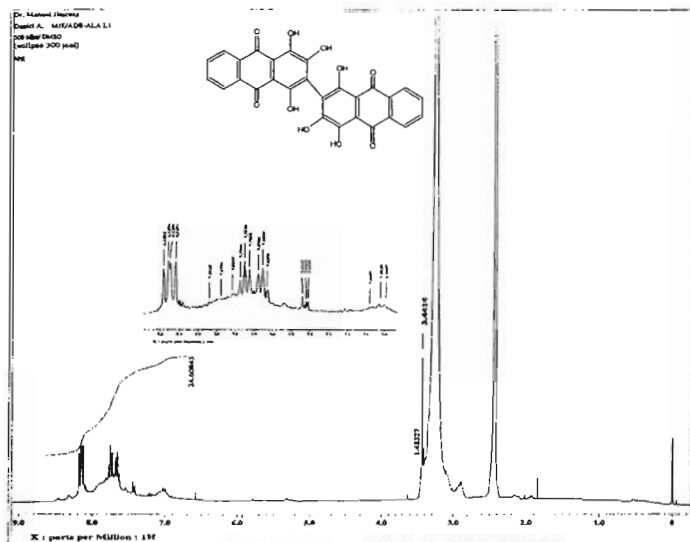
ESPECTRO DE MASAS DE 3,3'-BIALIZARINA: presentará un ión molecular a 480, correspondiente al peso molecular del dímero de alizarina, y una posterior fragmentación de m/z 452, 424, 398, correspondientes a las pérdidas CO y un pico de 240 correspondiente al monomero de alizarina.



ESPECTRO DE RMN-H DE PURPURINA: Singlete a δ 6.6 ppm para el prot3n 3 y un sistema AB para los protones 5,6,7 y 8.

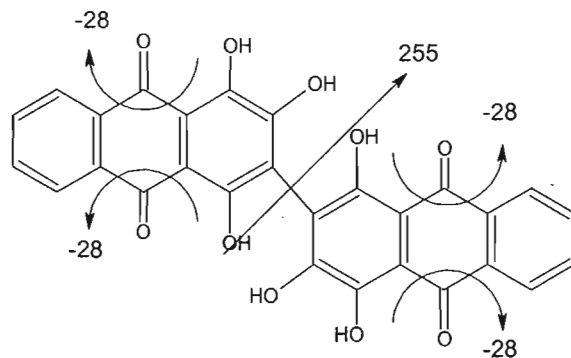
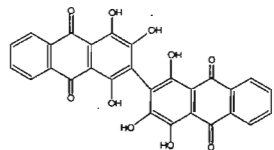
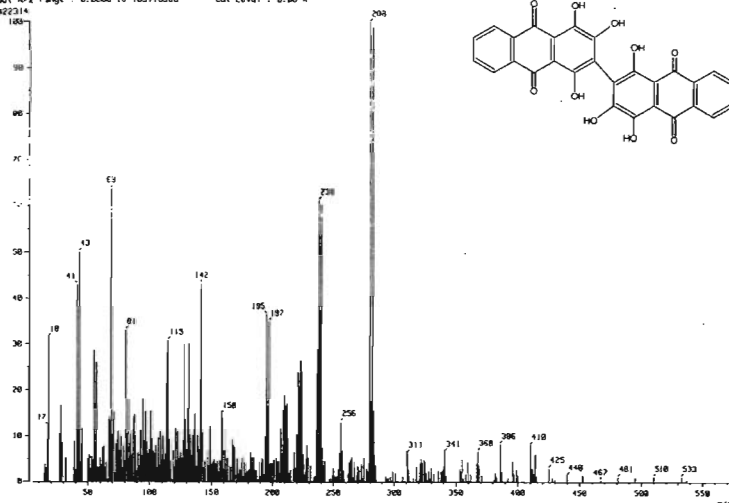


ESPECTRO DE RMN DE CARBONO DE LA ANTRAQUINONA PURPURINA.



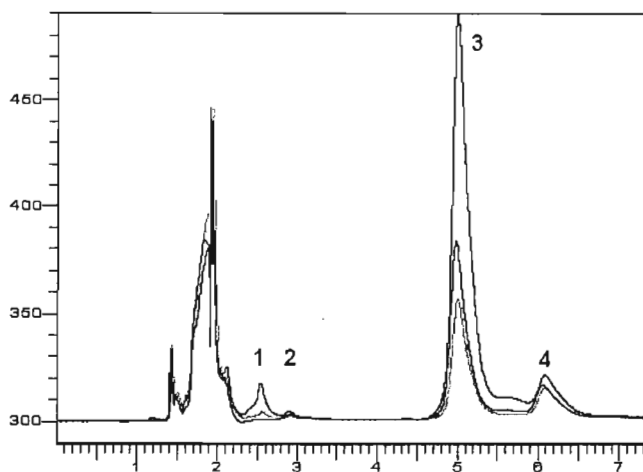
ESPECTRO DE 3,3'-BIPURPURINA: sistema AB en 7.9 y 8.2 ppm, correspondientes a los protones 5,5',6,6',7,7' y 8,8' del dimero.

Sample: PURP
 Note:
 Inlet : Direct Ion Mode : FID+
 Spectrum Type : Normal Ion (H⁺-Linear)
 RT : 1.35 min Scan# : 13,101 Temp : 150.7 deg.C
 BP : m/z 154.0000 Int. : 212.57
 Output m/z range : 0.0000 to 1051.0365 Cut Level : 0.00 k
 2422314

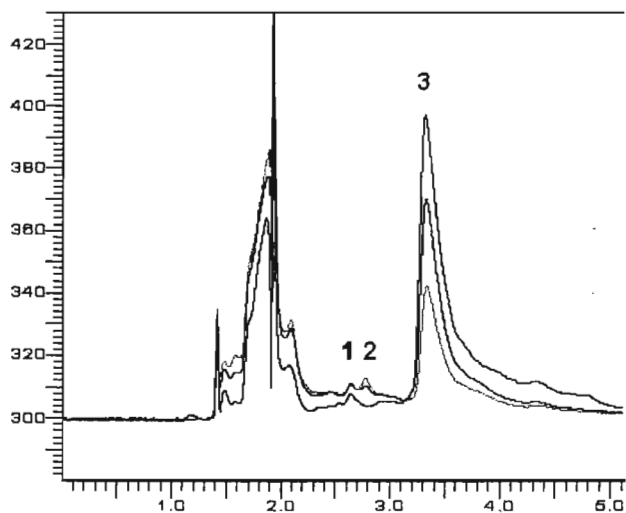


ESPECTRO DE MASAS DE 3,3'-BIPURPURINA: presenta un ion molecular a 510, correspondiente al peso molecular del dímero de purpurina, y una posterior fragmentación a 481, 453, 425, correspondientes a las pérdidas CO y un pico de 256 correspondiente al monómero de purpurina.

CROMATOGRAMAS Y ESPECTROS DE RMN Y MASAS DE LOS PRODUCTOS DE CONVERSION DE ANTRACENONAS CON LAS PEROXIDASA DE *S. angustifolia* Y LA PEROXIDASAS DE RABANO PICANTE (HORSERADISH PEROXIDASE, HRP)



CROMATOGRAMA 10: Conversión de la antracena de quinizarina con la peroxidasa de rábano picante (HRP). 1) Pico del intermediario del dímero de quinizarina. 2) Producto principal: dímero de quinizarina. 3) Quinizarin-antracena 4) Quinizarina.



CROMATOGRAMA 11: Conversión de la antracena de la alizarina con la peroxidasa de rábano picante (HRP). 1) Pico del intermediario del dímero de Alizarina. 2) Producto principal: dímero de la alizarina. 3) Alizarin-antracena.

