

**II ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES**

**TRANSFORMACIÓN MICROBIANA DE UN SUSTRATO NATURAL Y  
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS**

**DANIELA BUSTOS  
ALEJANDRA PASTOR**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS  
FFHA-UNSJ**

## ANTECEDENTES Y FUNDAMENTACIÓN:

La utilización de microorganismos como biocatalizadores altamente eficientes nos remonta atrás en el tiempo en que antiguas civilizaciones aprendieron a hacer vinagre, vino y queso. En tiempos modernos, nuestra civilización ha ampliado su relación amistosa con los microorganismos, no sólo a través de su utilización como única fuente para la producción de antibióticos indispensables y hormonas esenciales sino también desarrollando su uso como biocatalizadores regio y estereoespecíficos en la síntesis de muchos compuestos químicos importantes y farmacéuticos<sup>1</sup>.

La acidificación del vino al vinagre fue practicada en Babilonia 500 años a.C., pero fue solamente en 1894 cuando Pasteur percibió el papel de los microorganismos en la acetificación. Durante la última parte del siglo diecinueve Bertrand inició un enfoque sistemático de las transformaciones microbianas y a la vuelta del siglo se habían encontrado las siguientes reacciones: *Oxidación*: etanol a acético, glucosa a ácido glucónico; *Reducción*: ácido málico a ácido succínico, fructosa a manitol; *Hidrólisis*: taninos a ácido gálico, di- y tri-sacáridos a los monosacáridos constituyentes; *Resolución de mezclas racémicas* de: ácido tartárico (los famosos experimentos de Pasteur), ácidos láctico, mandélico y glicérico<sup>2</sup>.

Varias transformaciones fueron pronto añadidas, y así la observación de Mamoli y Vercellone en 1937 de que una levadura durante la fermentación pudo reducir 17-cetoesteroides a 17 $\beta$ -hidroxiesteroides, condujo 15 años más tarde a una de las más importantes aplicaciones de las biotransformaciones, la producción de hormonas esteroideas<sup>2</sup>.

Una de las mayores batallas libradas en la naturaleza es aquella observada entre las plantas y sus depredadores. Los hongos fitopatógenos constituyen un gran grupo de microorganismos que usualmente residen en la parte externa de las plantas y son uno de los principales objetivos del sistema de defensa de las mismas. Para combatir estos hongos las especies vegetales generan una gran cantidad de compuestos tales como terpenos, flavonoides y alcaloides, conocidos como fitoalexinas. Estos productos del metabolismo secundario de las plantas son, casi siempre, producidos en respuesta a una infección. Estos invaden la célula del microorganismo interrumpiendo su metabolismo, retardando así su crecimiento o aún matándolo<sup>3,4</sup>. Se puede postular, entonces, que las fitoalexinas son antibióticos de bajo peso molecular producidos *de novo* por las plantas superiores, en respuesta a la infección producida por microorganismos, principalmente hongos<sup>5</sup>.

A su vez, estos hongos han desarrollado respuestas a las fitoalexinas por medio de enzimas. Estas enzimas a menudo son muy similares a las P-450 monooxigenasas encontradas en humanos y otros mamíferos y son capaces de modificar los compuestos tóxicos que generan las plantas<sup>6</sup>.

La mayoría de las fitoalexinas y compuestos relacionados son hidrofóbicos. El modo usual que tiene un hongo para tratar estos compuestos tóxicos es metabolizarlos a compuestos hidrofílicos por desintoxicación a través de la introducción de grupo/s hidroxilo, por oxigenación, hidratación, reducción o ruptura de grupo carbonilo. Los metabolitos hidrofílicos pueden, por lo tanto, ser almacenados en vacuolas y excretados, y este proceso es similar a la oxidación en mamíferos de xenobióticos por la enzima citocromo P-450 monooxigenasa<sup>5</sup>.

En consecuencia, podemos considerar a estos hongos como muy aptos para la biotransformación de compuestos terpenoides, entre otros. Los terpenoides son un grupo de compuestos que se encuentran en la naturaleza y las enzimas desintoxicantes de los microorganismos tienen una amplia especificidad de sustrato. Hay numerosos ejemplos de fitoalexinas de estructura terpenoide<sup>3</sup> por lo tanto éstos serían sustratos aptos para ser biotransformados.

Es necesario detenerse por un momento en el concepto de **biotransformación**, para definirla como, una reacción química catalizada por microorganismos o por preparaciones de enzimas derivadas de ellos<sup>7</sup>. Se puede definir también, como un proceso biológico por el que un compuesto orgánico es modificado a un producto que posteriormente puede ser aislado, mediante reacciones sencillas, químicamente definidas, catalizadas por enzimas contenidas en las células<sup>2</sup>. En las biotransformaciones muchas enzimas aceptan además de sus sustratos naturales, sustratos extraños, pero compuestos estructuralmente relacionados, y por lo tanto catalizan reacciones “no naturales” con sustratos suministrados al medio de cultivo (compuestos xenobióticos). Los productos de la reacción que ya no son degradados se acumulan en el medio de cultivo, de donde pueden ser aislados<sup>6</sup>.

El incremento de los trabajos en este campo de la ciencia, a partir de 1980, se debe a varios factores tales como la mayor dedicación de los investigadores en el tema, la mayor accesibilidad a un amplia variedad de enzimas y el conocimiento de que muchas familias de enzimas pueden transformar una gran cantidad de compuestos no naturales, como así también sus sustratos naturales. Estas enzimas pueden obtenerse a partir del manejo de sistemas biológicos o aisladas a partir de estos sistemas en forma cruda o parcialmente purificada<sup>6</sup>.

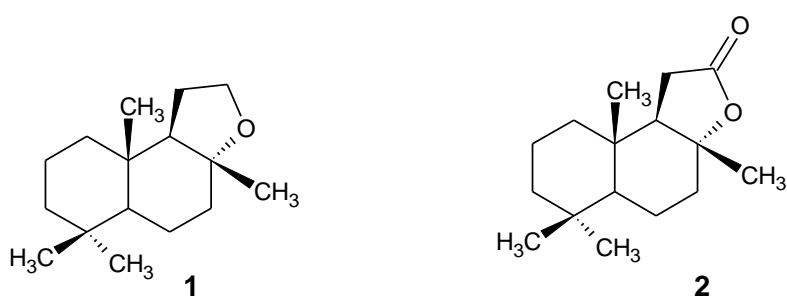
Tomando ventaja de las propiedades favorables de los procesos biocatalizados, las biotransformaciones se han empleado para llevar a cabo reacciones que son difícilmente o del todo no factibles por métodos químicos puros. Los problemas sintéticos típicos que han sido resueltos por biotransformaciones han sido los siguientes: introducción de un centro quiral en una molécula, resolución de mezclas racémicas (racematos), conversión selectiva de un grupo funcional particular en varios grupos con reactividades similares, funcionalización regio y estereoselectiva de un carbono específico no activado y reacciones bajo condiciones moderadas<sup>7</sup>.

Los microorganismos sirven también, como fuente de enzimas para uso en sistemas analíticos y las transformaciones microbianas juegan un papel importante en los estudios del metabolismo que deben acompañar a las evaluaciones clínicas de las drogas. Los “modelos microbianos” son útiles para predecir, y a veces necesarios para preparar, los metabolitos derivados de las drogas administradas a los animales y al hombre<sup>2</sup>.

Es decir entonces, que los “modelos microbianos del metabolismo de mamíferos” pueden ser definidos como el uso de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) para facilitar el estudio de biotransformaciones de xenobióticos en mamíferos, incluyendo el hombre. El número de animales de investigación necesarios para la evaluación de perfiles metabólicos de xenobióticos pueden ser significativamente reducidos cuando los microorganismos son usados como modelos predictivos, siendo beneficioso tanto para los puntos de vista económicos como humanitarios<sup>8</sup>.

(-)-Ambróxido (**1**) es un sustrato de estructura terpénica, barato y fácilmente disponible, es también un sustrato atractivo para biotransformaciones dado que está estructuralmente relacionado con fitoalexinas como el sclareolide (**2**) y no se encuentra en plantas. Dado que no comparte un nicho en la naturaleza con hongos fitopatógenos, la transformación de (-)-ambróxido por estos hongos puede resultar en compuestos novedosos no existentes en la naturaleza<sup>9</sup>.

Existen pocos antecedentes de la biotransformación de este tipo de compuestos. En uno de ellos Hanson y Truneh<sup>10</sup> realizaron la biotransformación de (-)-ambróxido (**1**) y sclareolide (**2**) para obtener compuestos oxidados en diferente posiciones de los anillos, utilizando el hongo *Cephalosporium aphidicola*. Farooq y Tahara<sup>11</sup> hicieron otro tanto empleando *Botrytis cinerea*. Se ha encontrado información acerca de la biotransformación de sesquiterpenos con grupos carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturados por medio de cultivos celulares vegetales<sup>12</sup>.



Para comprender el concepto de capacidad antioxidante podemos decir que el oxígeno es esencial para la vida, pero al mismo tiempo una fuente de continua agresión para todos los organismos vivos. Mientras el oxígeno en su estado fundamental triplete es débilmente reactivo, también suministra especies altamente agresivas, incluyendo oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), radical hidroxilo (OH<sup>·</sup>) y varios radicales peroxilos y alcoxilos. Estas especies reactivas de oxígeno se forman bajo la acción de radiación UV o

radiaciones ionizantes, por la presencia de varios químicos incluyendo metales de transición y muchos xenobióticos, pero también por enzimas o pérdida de electrones en el curso de rutas metabólicas. La generación de radicales libres es una parte integral del metabolismo normal. Sin embargo, si la producción de especies de oxígeno reactivas no es controlada adecuadamente, estas especies se tornan altamente destructivas para estructuras biológicas. Las especies de oxígeno reactivas, se sabe, causan daño a macromoléculas biológicas, alterando sus propiedades, y por ende la estructura y función de las células. Los radicales libres participan en la patogénesis de un creciente número de desórdenes incluyendo las dos causas mayores de muerte: cáncer y arterosclerosis. Los radicales libres de oxígeno también están reportados de estar involucrados en el asma, artritis, inflamación, neurodegeneración, enfermedad de Parkinson, mongolismo y quizás también demencia. El paso de los años puede ser la suma de las reacciones de radicales libres nocivos que ocurren continuamente en todas las células y tejidos. Por lo tanto, los radicales libres parecen constituir un blanco prometedor para mejorar el tratamiento con drogas de varias condiciones patológicas. En este contexto, los antioxidantes naturales están recibiendo una acrecentada atención. Ellos pueden servir como compuestos primarios para el desarrollo de nuevas drogas y representan también una alternativa en el uso de antioxidantes sintéticos como butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA) y propilgalato en tecnología alimenticia<sup>13</sup>.

Como puede observarse, los compuestos antioxidantes son de la más variada estructura, por lo que en este trabajo se propone determinar la **actividad antioxidante** de los metabolitos obtenidos, como una contribución a la obtención de este tipo de compuestos<sup>15</sup>.

Los bioensayos como **letalidad con brine shrimp** (*Artemia sp*) han guiado a aislar numerosos compuestos bioactivos con usos potenciales como agentes antitumorales, pesticidas, herbicidas y estimulantes del crecimiento de plantas. Este ensayo es indicativo de citotoxicidad, acciones farmacológicas y efectos pesticidas. Los compuestos bioactivos son casi siempre tóxicos en altas dosis. Por lo tanto, el ensayo de letalidad *in vivo* con un organismo zoológico tan simple puede ser usado como un buen monitoreo en el descubrimiento de nuevos productos bioactivos<sup>14</sup>.

### **OBJETIVO GENERAL:**

Realizar la biotransformación de un sustrato natural como (-)-ambróxido (**1**) usando un hongo filamentoso, en este caso *Fusarium verticillioides* como fuentes de enzimas.

### **OBJETIVO ESPECÍFICO:**

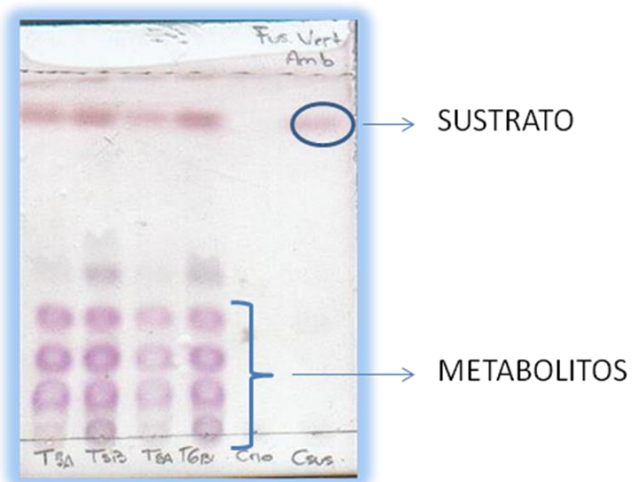
Obtención de compuestos de estructura novedosa o conocida a partir de la transformación de un sustrato orgánico por la acción de un microorganismo y realizar la evaluación comparativa de la

actividad antioxidante y bioensayo de letalidad con *Artemia persimilis* de los metabolitos obtenidos y sustratos de partida.

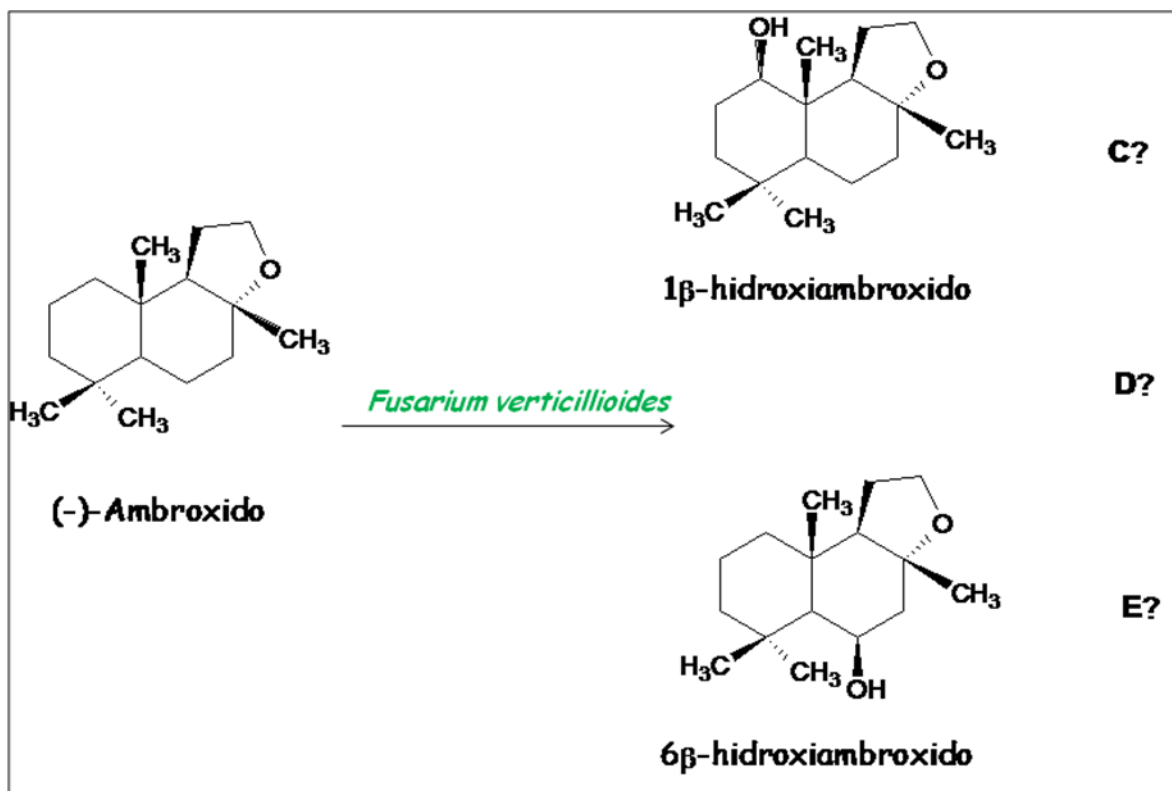
## DESARROLLO:

### Biotransformación a Gran Escala de (-)-Ambroxido (3) con *Fusarium verticillioides* en Medio Papa:

En el screening preliminar se pudo observar por cromatografía en capa delgada y utilizando como revelador solución de p-anisaldehído que las enzimas del microorganismo transformaron al sustrato de partida en 4 metabolitos más polares, apareciendo como manchas bien nítidas y separadas.



La biotransformación a gran escala se llevó a cabo por un período de 25 días, obteniendo un crudo de 256 mg. Luego de purificado mediante cromatografía en columna se obtuvieron finalmente cinco compuestos más polares que el sustrato de partida. Identificándose por el momento dos de ellos mediante espectroscopía de RMN de  $^1\text{H}$  como:  $1\beta$ -hydroxyambroxido y  $6\beta$ -hydroxyambroxido. Los otros tres compuestos están en proceso de identificación.



### Determinación de actividades biológicas:

Luego de realizada la purificación e identificación de los metabolitos obtenidos se determinaron las actividades biológicas de los mismos mediante los ensayos de actividad antioxidante mediante el método de DPPH y actividad citotóxica mediante el ensayo de letalidad con *Artemia persimilis*.

La técnica analítica usada para medir capacidad antioxidante está basada en un ensayo espectrofotométrico en el que una solución metanólica del radical difenilpicrilhidrazilo (DPPH) de color violeta intenso se trata con soluciones de las fracciones puras e impuras del compuesto. Al ser capturado el electrón libre del compuesto a analizar por parte del DPPH, su solución pierde la coloración.

Para determinar la capacidad antioxidante, se prepararon 100 ml de una solución de DPPH con una concentración de 20 mg/L. La solución se preparó en el momento de realizarse el ensayo y protegida de la luz con papel de aluminio, dado la inestabilidad de la misma. Se prepararon soluciones metanólicas de cada fracción con una concentración de 0,5 mg/ml aproximadamente. 0,75 ml de cada muestra se mezclaron con 1,5 ml de la solución de DPPH. Además, debieron prepararse un blanco muestra mezclando 0,75 ml de cada muestra con 1,5 ml de metanol y un blanco con 1,5 ml de DPPH y 0,75 ml de agua destilada. Se dejaron reaccionar todas las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente<sup>2</sup>.

Para realizar la medición espectrofotométrica de cada muestra, se encendió el espectrofotómetro (ANEXO Fig. 9) 30 minutos antes de su uso para que el mismo se estabilice. Antes de realizar las mediciones se ajustó a cero con metanol. Una vez tomadas todas estas precauciones se procedió a la medición de la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 510 nm. Luego, se calculó la capacidad antioxidante (capacidad atrapadora de radicales libres) de cada muestra con la siguiente forma expresada en %:

$$\% \text{ inhibición de DPPH} = (1 - A_{\text{compuesto}} / A_{\text{blanco}}) \times 100$$

La actividad antioxidante se midió a distintas concentraciones tanto del sustrato de partida como de los metabolitos obtenidos, utilizando como sustancia patrón al ácido ascórbico.

Los resultados observados en la tabla son los % de inhibición calculados para cada compuesto a las distintas concentraciones.

Concentración	Ácido ascórbico	Amboxide	1β-hidroxiambroxide	6β-hidroxiambroxide
0,005mg/ml	96	36	43	39
0,01mg/ml	97	36,1	49	40
0,015mg/ml	98	38	51	41
0,02mg/ml	99	40	55	42

Los resultados obtenidos del ensayo de actividad citotóxica con *Artemia persimillis* fueron analizados mediante el programa Finney dando los siguientes datos de dosis efectiva (dosis que produce el 50% de muerte en la población de larvas de *Artemia*)

1β-hidroxiambroxide: ED<sub>50</sub>=27,1492

6β-hidroxiambroxide: ED<sub>50</sub>=53,2416

#### CONSIDERACIONES FINALES:

- Las enzimas producidas por *Fusarium verticillioides*, serían los biocatalizadores responsables de la oxidación estereo y regioselectiva de (-)-Ambroxide en carbono 1 y 6.



- Los metabolitos obtenidos poseen mayor capacidad antioxidante que el compuesto de partida. Se observa una diferencia mayor en el compuesto 1 $\beta$ -hidroxiambroxide.
- Con respecto al ensayo de letalidad sobre *Artemia*, se observa que ambos metabolitos muestran una citotoxicidad claramente menor que el compuesto de partida.
- La metodología que se ha seguido en este trabajo, ha probado ser de utilidad en el uso de microorganismos, y en especial un hongo filamentoso fitopatógeno (*Fusarium verticillioides*), como herramienta para obtener compuestos funcionalizados, a partir de sustratos orgánicos exógenos y con potenciales usos como agentes bioactivos.

## **BIBLIOGRAFÍA:**

1. Abourashed, E.A., A.M. Clark & C.D. Hufford. Microbial Models of Mammalian Metabolism of Xenobiotics: An Updated Review, *Current Medicinal Chemistry*, **6**, 359-374 (1999).
2. Bu'Lock, J. & Kristiansen, B. *Biología Básica*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España, pp 463-481 (1991).
3. Harborne, J.B. *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Chapman & Hall, London, UK, 89 (1998).
4. Cutler S.J., Cutler, H.G. *Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals*, CRC Press, Boca Ratón, USA, 110 (2000).
5. Farooq A., Tahara S. Fungal metabolism of flavonoids and related phytoalexins, *Curr. Top. Phytochemistry* **2**:1-33 (1999).
6. Rojas M.C., Hedden P., Gaskin P., Tudzynski B. The P450-1 gene of *Gibberella fujikori* encodes a multifunctional enzyme in gibberellins biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:5838-5843 (2001).
7. Leuenberger, H.G.W. Biotransformation- A useful tool in organic chemistry, *Pure & Appl. Chem.*, **62**, 753-768 (1990).
8. Kouzi, Samir A. Metabolism Studies of the Diterpene Sclareol. Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, The University of Mississippi, Mississippi, USA (1991).
9. Gierman, Hincó J. Practical Time Organic Chemistry, Laboratorio de Química, Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de San Juan, San Juan, Noviembre 2001.
10. Hanson J.R., Truneh A. The biotransformation of Ambrox and Sclareolide by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry* **42**:1021-1023 (1996).

11. Farooq A., Tahara S. Oxidative metabolism of ambrox and sclareolide by *Botrytis cinerea*. *Z. Naturforsch [C]* **55**:341-346 (2000).
12. Hegazy M-E.F, Kuwata C., Matsushima A., Ahmed A.A. Biotransformation of sesquiterpenoids having  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl groups with cultured plant cells of *Marchantia polymorpha*. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*. **39**:13-17 (2006).
13. Pottrat, O. Antioxidants and Free Radical Scavengers of Natural Origin. *Current Organic Chemistry*, **1**, 415-440 (1997).
14. Mc Laughin, J., Chang, C. and Smith, D. "Bench-Top" Bioassays for the Discovery of Bioactive Natural Products: an update. *Studies in Natural Products Chemistry*. **9**, 383-405 (1991).
15. Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26 (2): 211-219 (2004).
16. Agrios, G. N. Fitopatología. Ediciones Noriega, México. 2 da Edición, Capítulo 11 (1990).