

ESTUDIO DEL EFECTO DE β -CICLODEXTRINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA POLIFENOLOXIDASA DE PERA BLANCA DE ARANJUEZ

Melo Gisela M., Sancho Matías I. y Gasull, Estela I.

Proyecto 02-2118. Área de Química Física. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. IMIBIO-Conicet. 5700. San Luis.
gisela22arg@gmail.com

Introducción

La **Polifenoloxidasas (PFO)** es la enzima que produce el pardeamiento enzimático en frutas y vegetales. Es una enzima que contiene cobre y se halla ampliamente distribuida en el reino vegetal. Esta enzima es la encargada de producir el pardeamiento observado en frutas y verduras frescas, y productos derivados de éstos, modificando las características nutricionales y organolépticas de estos alimentos, depreciando su calidad. En la reacción que cataliza, se forman quinonas (pigmentos pardo-marrones) a partir de compuestos fenólicos (sustrato de la enzima), como el **4-tert-butilcatecol (TBC)**.

La acción de esta enzima produce la oxidación de los fenoles endógenos a quinonas, y puede ser inhibida por calentamiento, por eliminación del oxígeno en la atmósfera que rodea el alimento o por agentes químicos. Debido a las pérdidas económicas que ocasiona la acción de la PFO en la industria frutihortícola, se busca constantemente limitar y/o inhibir su acción.

Las **ciclodextrinas (CD)** son azúcares macrocíclicos naturales que debido a su estructura forman complejos con compuestos poco solubles en agua, como el TBC.



Objetivo del trabajo

Estudiar si la disminución de la actividad enzimática de PFO de Pera Blanca de Aranjuez (PFO_A) en presencia de β -ciclodextrina (β CD) se debe a la formación de un complejo de inclusión con el sustrato (β CD-TBC).

Métodos

Con la finalidad de comprobar la formación del complejo β CD-TBC, se determinó su constante (K_c) utilizando el método de Higuchi-Connors (1).

Además, se obtuvieron los espectros FTIR del complejo β CD-TBC, de las drogas puras (β CD y TBC) y de la mezcla física de ambos en relación 1:1.

(1) Del Valle, E. Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochemistry*, 2004, 39, 1033-1046.

Resultados y Conclusiones

Del análisis del diagrama de solubilidad de fases (Fig. 1) se pudo inferir una estequiometría 1:1 para el complejo de inclusión, β CD-TBC, y se obtuvo para la K_c un valor de $12899 \pm 1195 \text{ M}^{-1}$.

Observando los FTIR obtenidos (Fig. 2), se perciben diferencias entre los espectros de TBC y de β CD-TBC, que además no se podrían atribuir a la mezcla física y/o a la β CD pura. Esto se consideró como evidencia de la formación del complejo de inclusión.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la β CD sobre la actividad de PFO_A . Teniendo en cuenta que existe una relación no lineal entre la velocidad de reacción enzimática y la concentración de β CD presente en el medio de reacción, se obtuvo el valor de K_c utilizando la ecuación de velocidad de Michaelis-Menten modificada (Ec. 2, (2)). Para la aplicación de esta ecuación se utilizaron los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y K_M ($9,36 \text{ mM min}^{-1}$ y $13,19 \text{ mM}$, respectivamente) obtenidos a partir de la evaluación de la actividad de PFO_A frente a TBC en ausencia de β CD. El valor de K_c fue 16888 M^{-1} , similar al obtenido por otros autores.

Se pudo observar que al incluir β CD en el medio de reacción, los compuestos fenólicos de la fruta fueron oxidados por PFO_A a la misma quinona producida en ausencia de β CD. Además, se observó que la velocidad de oxidación ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$) disminuyó progresivamente a medida que se aumentó la concentración de β CD, evidenciando que el efecto inhibitorio de la actividad enzimática se debe a la formación del complejo de inclusión.

(2) Orenes Piñero, E., García Carmona, F. y Sánchez Ferrer, A. Kinetic characterization of diphenolase activity from *Streptomyces antibioticus* tyrosinase in the presence and absence of cyclodextrins. *Journal of Molecular Catalysis B*, 2007, 47, 144-148.

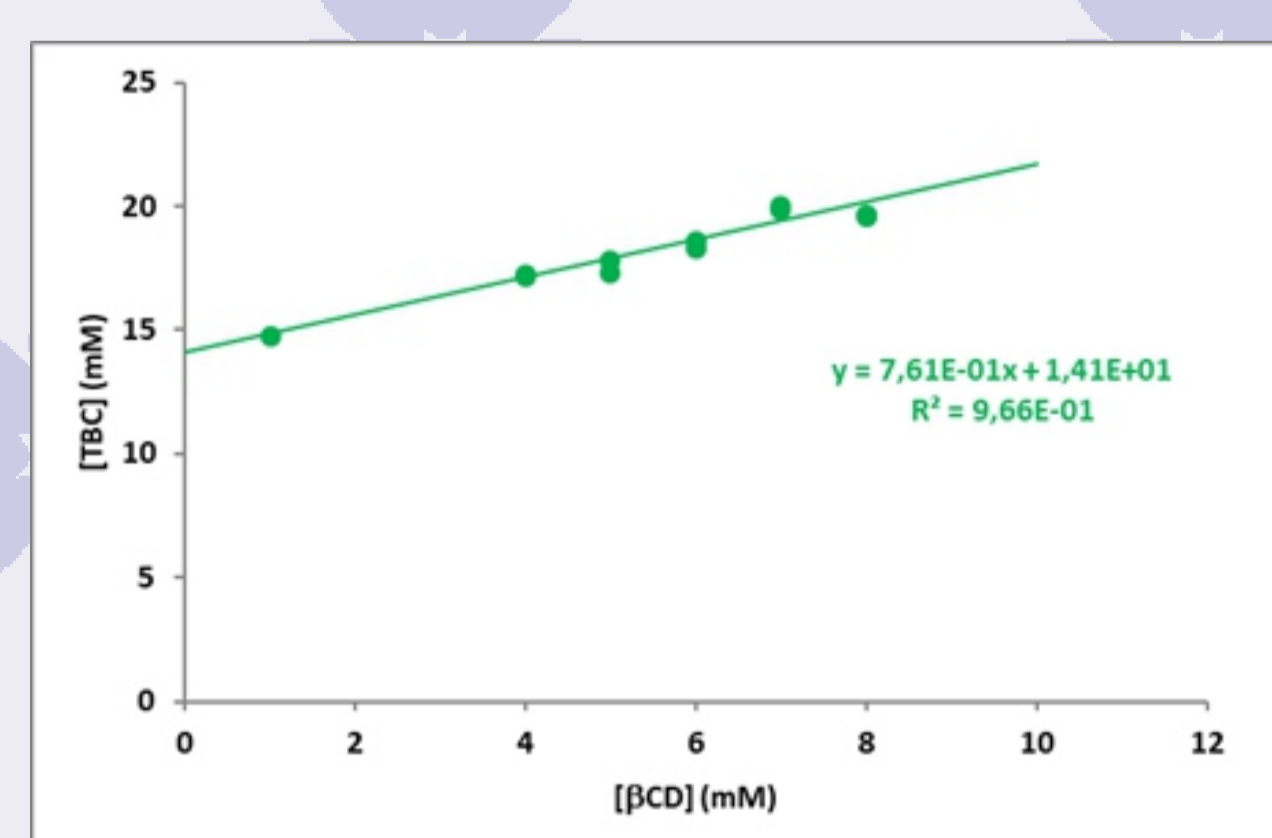


Fig. 1. Diagrama de solubilidad de fases para el sistema β CD-TBC.

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} [TBC]_f}{K_M + [TBC]_f}$$

Ec. 1. Expresión de la ecuación de velocidad de Michaelis-Menten.

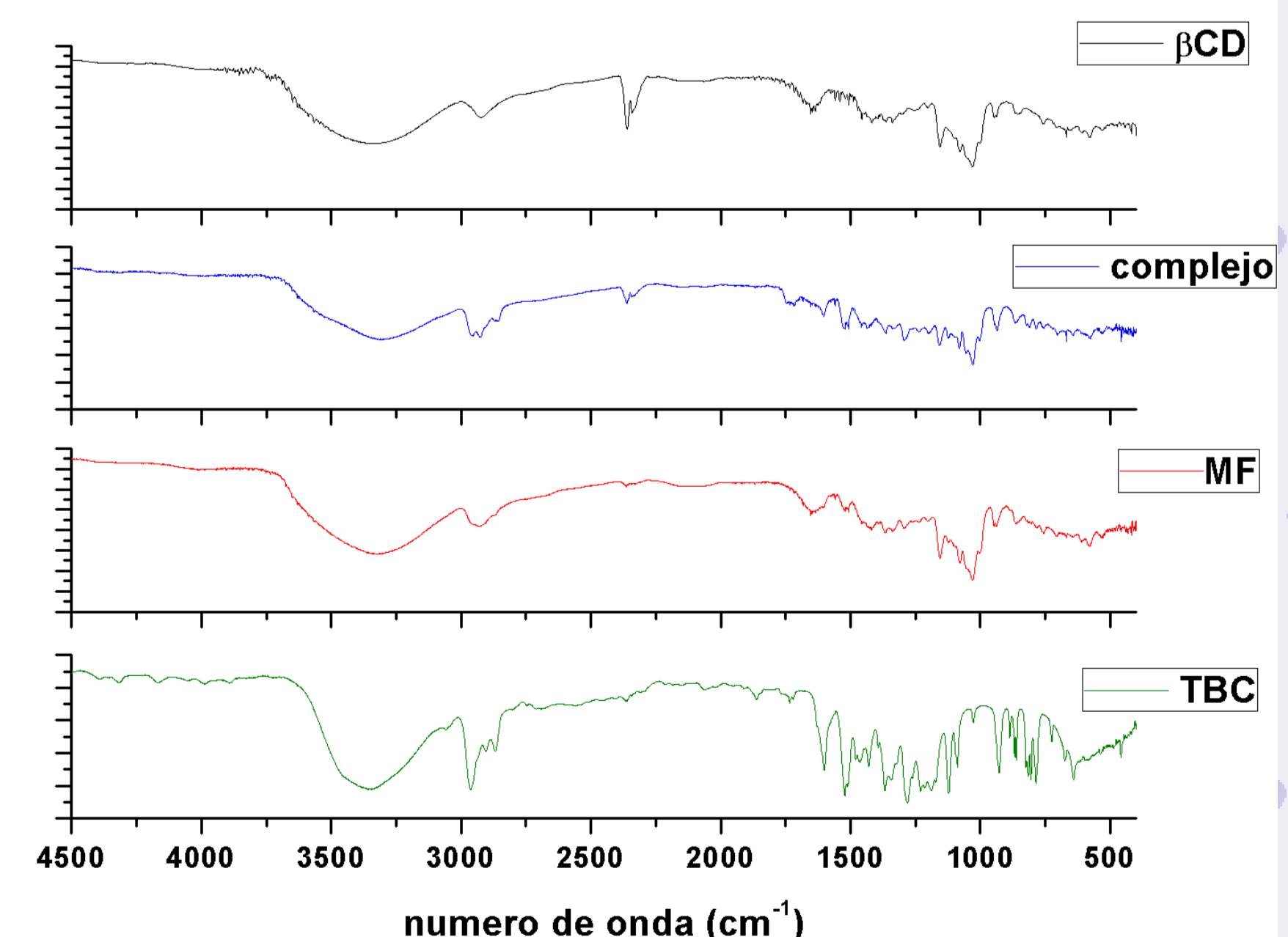


Fig. 2. FTIR de β -Ciclodextrina (β CD), 4-tert-butilcatecol (TBC), mezcla física 1:1 y complejo β CD-TBC.

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} [(-[\beta CD]_t K_C - [TBC]_t K_C + 1) + \sqrt{([\beta CD]_t K_C - [TBC]_t K_C + 1)^2 + 4K_C [TBC]_t / 2K_C}]}{(K_M + [(-[\beta CD]_t K_C - [TBC]_t K_C + 1) + \sqrt{([\beta CD]_t K_C - [TBC]_t K_C + 1)^2 + 4K_C [TBC]_t / 2K_C}]}$$

Ec. 2. Modificación de la ecuación de velocidad de Michaelis-Menten (2).