



“Pardeamiento de vegetales: recuperación de enzimas que lo producen e identificación de sus inhibidores mediante síntesis dirigida por efecto biológico”
Melisa Engelbrecht (1,2), Nadia Voitovich Valetti (2), Carlos E. Boschetti (2),
Ignacio Cabezudo (1)

(1) Área Farmacognosia, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Santa Fe, Argentina.

(2) Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos de Rosario (IPROBYQ-CONICET). Mitre 1998, Rosario, Santa Fe, Argentina.

Dirección de e-mail: melisa.engelb@gmail.com

RESUMEN

Palabras claves: *Malus domestica*, Polifenol oxidasa, bioautografía, purificación sustentable.

El pardeamiento de frutas y vegetales recién cortados es el resultado de la acción de varias enzimas. De todas ellas la más importante es la polifenol oxidasa (PPO), responsable de catalizar la oxidación de compuestos fenólicos a ortoquinonas. Evitar dicha reacción es de gran interés en la industria alimenticia ya que se ven afectadas las propiedades organolépticas, el valor nutricional y la seguridad de los mismos. En el presente trabajo se eligió a la manzana como modelo biológico atento a ser uno de los alimentos de mayor producción mundial. La bioautografía por cromatografía de capa fina (CCD) es una técnica muy adecuada para la evaluación de las propiedades de inhibición de enzimas ya que permite separar los compuestos al mismo tiempo que revela su actividad, utilizando tirosinasa fúngica atrapada en gel de agar. A la hora de realizar una búsqueda de inhibidores, en la mayoría de los casos se emplea tirosinasa fúngica como enzima de prueba, e ignoran las diferencias en la respuesta inhibitoria de las PPO de diferentes fuentes. Por lo tanto, es clave utilizar la enzima del propio alimento en estudio después de realizados los procesos de selección inicial de inhibidores para evaluar su eficacia. Es por ello que el grupo de trabajo tuvo como objetivo encontrar nuevos inhibidores de las PPO, sintetizarlos y analizar su actividad frente a la propia enzima de manzana, la cual se buscó purificar mediante el desarrollo de un método que permita aislar la enzima, sea sustentable y escalable. Utilizando síntesis dirigida al efecto biológico, con reacciones químicas simples y bioautografía como método de detección se generó una biblioteca de 16 tiosemicarbazonas como posibles inhibidores partiendo de tiosemicarbazidas y aldehídos como bloques de construcción. Cuatro de ellos demostraron tener actividad inhibitoria en la placa cromatográfica (semi-cuantitativa). Los cuatro inhibidores hallados fueron sintetizados y purificados por recristalización con buen rendimiento (de 27.13 a 83.73 %) e identificados mediante RMN. Los compuestos A1T1 y A5T1 son a priori los más activos, para la verificación estamos en camino de purificar la enzima para tener un resultado cuantitativo más confiable. El estudio de la enzima de manzana sobre el extracto crudo demostró que la misma posee buena estabilidad en un amplio rango de pH. Para la purificación de la PPO de manzana se utilizó como agente precipitante los polímeros negativamente cargados Carragenano y L-Eudragit, los cuales no demostraron ser efectivos, y uno



positivamente cargado, Chitosan, que demostró eficiencia para la precipitación de la enzima. La eficacia de la purificación se evaluó mediante medidas de actividad enzimática utilizando pirogalol como sustrato y proteínas totales empleando ácido bicinconínico. Cuando estemos conformes con la purificación, la PPO de manzana será utilizada para evaluar la actividad inhibitoria de los compuestos y poner los inhibidores a prueba frente al propio sistema biológico en estudio.