

## CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DEL ENZIMA POLIFENOL OXIDASA EN FRUTAS TROPICALES: IMPLICACIONES EN SU PROCESO DE INDUSTRIALIZACIÓN

### RESUMEN

En este trabajo se hace una caracterización preliminar del enzima Polifenol Oxidasa (PPO), responsable del deterioro nutricional de *Physalis peruviana* L (uchuva) y *Solanum hirtum* X *Solanum quitoense* (lulo), frutas de alto potencial en mercados internacionales. Para ello, se evalúan la cinética de reacción de un extracto enzimático concentrado y la capacidad inhibitoria de compuestos obtenidos a partir de fuentes naturales. Las diferencias entre los PPO del extracto enzimático de lulo y uchuva, con valores de velocidad de reacción de  $1,32 \times 10^{-4} \pm 1,15 \times 10^{-5}$  y  $9,83 \times 10^{-3} \pm 1,49 \times 10^{-4}$  respectivamente, podrían estar relacionadas con una mayor cantidad del enzima en lulo. Por otra parte se hace un análisis del porcentaje de inhibición y una medición de absorbancia a punto final, para determinar no solo la capacidad inhibitoria sino también tener una aproximación a la duración de su efecto en el tiempo.

**PALABRAS CLAVES:** *Solanum hirtum* X *Solanum quitoense*, *Physalis peruviana* L, polifenoloxidasas.

### ABSTRACT

*In this work a preliminary characterization of Polyphenol Oxidase enzyme (PPO) was done, this enzyme is responsible of nutritional deterioration of Physalis peruviana (uchuva) and Solanum hirtum X Solanum quitoense (lulo), fruits with highly potential international market. In order to do it, the kinetic reaction of an enzymatic concentrate extract from fruits and the inhibitory activity of some compounds from natural sources were evaluated. The differences between PPO extracts from lulo and uchuva, with values of reaction velocity of  $1,32 \times 10^{-3} \pm 1,15 \times 10^{-4}$  y  $9,83 \times 10^{-4} \pm 1,49 \times 10^{-5}$  respectively, could be related with high enzyme concentration in lulo. On the other hand, an analysis of inhibition percentage and maxim absorbance was performed, in order to determine not only the inhibitory capacity of compounds, but also their duration along the time.*

**KEYWORDS:** *Solanum hirtum* X *Solanum quitoense*, *Physalis peruviana* L, Polyphenol Oxidase.

### 1. INTRODUCCIÓN

El polifenol oxidasa (PPO) es un metaloenzima que se encuentra ampliamente distribuido en plantas y hongos [1]. El PPO contiene dos átomos de cobre en el sitio activo que catalizan dos tipos de reacciones usando  $O_2$  como agente oxidante: (a) la o-hidroxilación de monofenoles para producir o-difenoles (actividad monofenol monoxigenasa E.C. 1.14.18.1); y (b) la posterior oxidación de o-difenoles a o-quinonas (actividad catecolasa E.C. 1.10.3.1) [1].

La reacción general sugiere que el enzima cataliza la formación de quinonas altamente reactivas que reaccionan con grupos amino o sulfhidriilo de proteínas. Estas reacciones generan cambios en las características físicas, químicas y nutricionales del alimento. Las quinonas también pueden conducir a la polimerización y a reacciones de condensación entre proteínas y polifenoles, produciendo como consecuencia pigmentos de color café, proceso

### KATALINA MUÑOZ DURANGO

Química Farmacéutica.  
Candidata a Ph.D

Sede de Investigación en  
Sustancias Bioactivas -SIU  
Universidad de Antioquia  
kmunos@gmail.com

### KARENT E. BRAVO MUÑOZ

Química Farmacéutica.

Sede de Investigación en  
Sustancias Bioactivas -SIU  
Universidad de Antioquia  
karenbramu@gmail.com

### PAOLA ZAPATA OCAMPO

Química Farmacéutica. Ms.c

Grupo de Biotecnología -SIU  
Universidad de Antioquia  
paozapata@gmail.com

### JULIÁN LONDOÑO LONDOÑO

Químico Farmacéutico.

Sede de Investigación en  
Sustancias Bioactivas -SIU  
Universidad de Antioquia  
jalondo@gmail.com

conocido como “pardeamiento enzimático” que va en detrimento del perfil nutricional del alimento [2-4]. Dado el impacto negativo de ésta reacción para la industria alimenticia, los PPO son ampliamente estudiados, sin embargo su función en muchos vegetales no ha sido totalmente resuelta [5].

En las llamadas “frutas exóticas”, los trabajos de este tipo son bastante exigüos y, en muchos casos, se desconocen los procesos implicados en la variación de parámetros relacionados con el valor nutricional, debido a los cambios que tienen lugar en la pos-cosecha y en el procesamiento. Actualmente frutas como el lulo (*Solanum hirtum* X *Solanum quitoense*) y la uchuva (*Physalis peruviana* L) son productos de amplia visión commercial, en el caso de la uchuva, Colombia ocupa el primer lugar en la producción mundial [6].

Por lo tanto, en el presente trabajo se hace una caracterización cinética preliminar del PPO de uchuva y

lulo y se evalúan diferentes compuestos como potenciales inhibidores aplicables a los procesos industriales que permitan obtener unas condiciones óptimas de transformación.

## 2. CONTENIDO

### 2.1 Metodología

#### 2.1.1 Elaboración de extracto enzimático:

La extracción de la fracción enriquecida en PPO se llevó a cabo a 4°C. Tanto para lulo como para uchuva, se partió de 120 g de fruta fresca, se porcionó rápidamente y se maceró en buffer fosfato 0.2M (pH: 6.5) durante 15 segundos. Luego todo el contenido se filtró y al jugo se le adicionó una solución de tritón al 1,5% en buffer fosfato pH 6.5 y se agitó durante 30 minutos. Seguidamente, el jugo se centrifugó a 4000g durante 60 minutos (Centrifuga refrigerada Eppendorf 5810R). Al sobrenadante se le adicionó acetona para precipitar el enzima y se centrifugó durante 15 minutos a 4000g. Finalmente, el precipitado se reconstituyó en buffer fosfato 0.2 M y se almacenó a -20°C hasta su uso.

#### 2.1.2 Actividad enzimática del extracto de PPO de lulo y uchuva:

La medida de la actividad enzimática se realizó por monitoreo espectrofotométrico de la formación de *o*-quinonas a 30°C (Espectrofotómetro CaryBio50). Para determinar la actividad enzimática se emplearon como sustratos la tirosina y el ácido gálico a una concentración de 10 uM. La mezcla de reacción fue de 980 uL, (Buffer fosfato 0.2M, ácido gálico o tirosina 10uM, agua) y 20uL de extracto enzimático. Se realizaron mediciones cada 2 minutos durante 12 horas, haciendo un barrido en el intervalo 280-600 nm. Cada ensayo se realizó por triplicado y como control de esta reacción se tomó 1.0 mL de la mezcla de reacción, sin adicionar extracto enzimático [7].

#### 2.1.3 Actividad inhibitoria de compuestos de fuentes naturales:

Se evaluaron como potenciales inhibidores de PPO los siguientes compuestos: Timol, hesperidina, ácido tánico y los siguientes aditivos para alimentos, permitidos por la Unión Europea y referenciados con el código E: ácido láctico (E270), ácido ascórbico (E300), ácido cítrico (E330) y ácido tartárico (E334). Se realizó la misma metodología descrita en el numeral 2.1.2, pero en lugar de agua se adicionó el potencial inhibidor en una concentración de 2mM. Cada reacción se realizó por triplicado y como control de esta reacción se tomó 1.0 mL de la mezcla de reacción, sin adicionar extracto enzimático.

Todos los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico GradPad prisma versión 4 para Windows.

## 2.2 Resultados

Luego de evaluar los dos sustratos: tirosina y ácido gálico, se determinó, según el comportamiento cinético de ambos enzimas, que el ácido gálico es el sustrato óptimo para este modelo (datos no mostrados). En las figuras 1 y 2 se presentan las cinéticas para la actividad PPO de lulo y uchuva con los respectivos inhibidores.

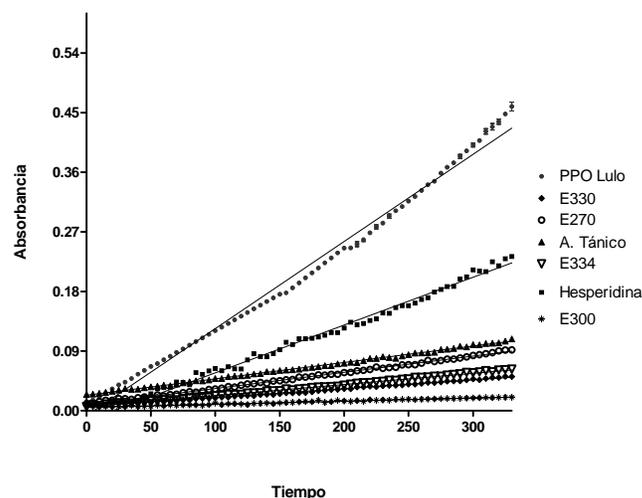


Figura 1. Cinética de reacción del extracto enzimático de lulo con los respectivos inhibidores.

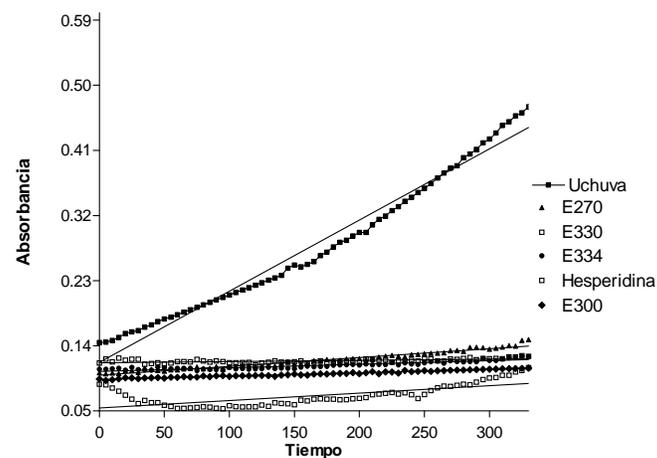


Figura 2. Cinética de reacción del extracto enzimático de uchuva con los respectivos inhibidores

Para obtener los porcentajes de inhibición de los compuestos propuestos, se obtuvieron las respectivas pendientes (m) de las gráficas 1 y 2. La pendiente representa la velocidad de reacción y por lo tanto se verá afectada si ocurre una inhibición del enzima. Con ese fin

se realizó una regresión lineal para obtener las pendientes expresadas en la tabla 1.

Compuestos	PPO Uchuva	PPO Lulo
	m ± SD	m ± SD
E270	1,21x10 <sup>-4</sup> ± 1,37x10 <sup>-5</sup>	2,45x10 <sup>-4</sup> ± 1,58x10 <sup>-6</sup>
E330	1,67x10 <sup>-5</sup> ± 2,84x10 <sup>-6</sup>	1,32x10 <sup>-4</sup> ± 1,19x10 <sup>-6</sup>
E334	4,93x10 <sup>-5</sup> ± 2,74 x 10 <sup>-5</sup>	1,70x10 <sup>-4</sup> ± 1,79 x 10 <sup>-6</sup>
E300	4,62x10 <sup>-5</sup> ± 4,48x10 <sup>-6</sup>	4,65x10 <sup>-5</sup> ± 1,03x10 <sup>-6</sup>
A. Tánico	ND	2,44x10 <sup>-4</sup> ± 2,14x10 <sup>-6</sup>
Hesperidina	1,03x10 <sup>-4</sup> ± 1,072x10 <sup>-5</sup>	7,22x10 <sup>-5</sup> ± 1,05 x 10 <sup>-5</sup>
Sin Inhib.	9,83x10 <sup>-4</sup> ± 1,49x10 <sup>-5</sup>	1,32x10 <sup>-3</sup> ± 1,15x10 <sup>-5</sup>

Tabla 1. Pendiente (m) ± SD (desviación estándar).

El porcentaje de inhibición (% Inh) de PPO de lulo y uchuva (ver tabla 2) se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% Inh = \left(1 - \frac{mx}{mb}\right) * 100$$

Donde, *mx* corresponde a la pendiente de la recta trazada para cada compuesto a evaluar y *mb* corresponde a la pendiente de la recta trazada para cada compuesto en el experimento enzima+sustrato sin inhibidor.

Compuestos	PPO Lulo <sup>a</sup>		PPO Uchuva <sup>b</sup>	
	% Inh	SD	% Inh	SD
E270	81,9	0,57	88,1	5,23
E330	90,3	0,21	98,9	0,85
E334	87,4	0,71	95	0
E300	96,7	0,28	95,0	0,07
A. Tánico	82	1,63	N.D	ND
Hesperidina	45,3	1,2	89,6	4,6

Tabla 2. Porcentaje de inhibición de los compuestos sobre el PPO de a. lulo y b. uchuva, SD desviación estándar, ND no determinado.

Con el fin de analizar comparativamente los compuestos inhibidores de los respectivos extractos enzimáticos aislados de lulo y uchuva, se graficó para cada inhibidor, el valor de *A<sub>max</sub>* (Absorbancia máxima) luego de 500 minutos, para obtener así un parámetro de punto final. Tal y como se puede observar en la gráfica 3.

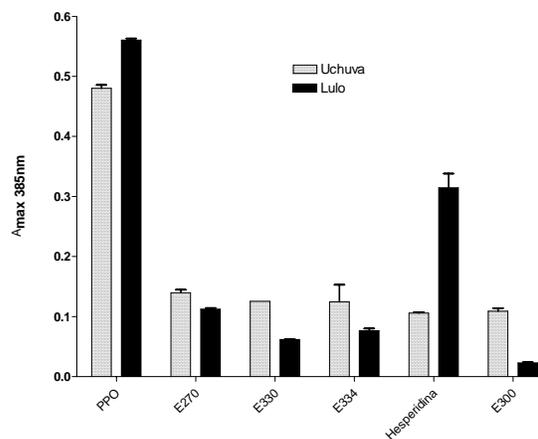


Gráfico 3. Absorbancia máxima para un punto final

### 3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De los dos sustratos evaluados, el más adecuado fue el ácido gálico, a diferencia de la tirosina, la cual es un buen sustrato para otro tipo de PPO (como es el caso de tirosinasa en mamíferos). Esto puede deberse a las diferencias entre los enzimas de cada organismo, de allí, la importancia de estudiar cada caso particular.

Se pudo observar que el proceso de extracción de la fracción enzimática fue adecuado ya que la actividad del enzima fue corroborado espectrofotometricamente en el ensayo con el sustrato. El comportamiento de los enzimas PPO, tanto en lulo como de uchuva, difieren notablemente; en este punto se analizan las velocidades de reacción correspondientes a las cinéticas de los experimentos para lulo y uchuva con ácido gálico como sustrato, en donde para cada uno es de 9,83x10<sup>-4</sup> ± 1,49x10<sup>-5</sup> y 1,32x10<sup>-3</sup> ± 1,15x10<sup>-5</sup> respectivamente (ver tabla 1). Con un valor P<0.0001 (\*\*\*), podemos concluir que las diferencias entre las velocidades de reacción son extremadamente significativas. Es probable, según esta evidencia, que haya una mayor concentración de PPO en lulo. Esto podría estar relacionado con el rápido pardeamiento enzimático para lulo al momento de ser procesado; sin embargo, esto debe confirmarse mediante estudios cuantitativos.

En la *gráfica 3* se puede apreciar la absorbancia máxima del producto de reacción entre los respectivos extractos enzimáticos, el sustrato y los inhibidores, en un tiempo finito tomado como punto final. Este gráfico es de particular interés puesto que es un indicativo de la actividad inhibitoria de los compuestos en el tiempo, por lo tanto no solo será relevante que el efecto inhibitorio sobre el enzima sea alto, sino que perdure. Resulta muy interesante ver como el E300, un potente inhibidor de PPO según los resultados obtenidos, con altos porcentajes de inhibición sobre el enzima de lulo y uchuva (96% y 95%, respectivamente), presente una diferencia

estadísticamente significativa del valor de *Amax* en el punto final ( $P < 0,001$  (\*\*)), lo cual podría indicar, que aunque es un muy buen inhibidor para ambas fuentes de PPO, puede resultar que no conserve su efecto en el tiempo para inhibir el PPO de uchuva. Otra correlación importante es la de la Hesperidina, que aunque no es el mejor inhibidor, evidencia una diferencia altamente significativa, tanto en los porcentajes de inhibición como en la *Amax* de punto final,  $P < 0,001$  (\*\*), para los PPO de lulo y uchuva. Sin embargo no existe diferencia significativa de los inhibidores E334, ni E270 sobre los enzimas de lulo y uchuva ( $P > 0.05$ ) en el análisis de *Amax* de punto final (test de comparación multiple Newman-Keuls ANOVA de una vía), lo cual para este caso en particular sugiere que tienen la misma capacidad para inhibir los enzimas de ambas fuentes.

Es importante resaltar la necesidad de caracterizar los PPO de cada fruta individualmente. Como se pudo ver en los resultados, tanto de cinética como de inhibición de ambas fuentes de extracto enzimático, se presentan diferencias estadísticamente significativas y por lo tanto no se puede asumir que un inhibidor de PPO en una matriz alimenticia va a funcionar de igual manera en otra. Esto está de acuerdo con los reportes recientes, donde se ha logrado en una pequeña fracción de las frutas comestibles (manzana, pera, durazno, banano y aguacate) conocer el comportamiento del PPO y plantear estrategias para su inhibición [8-11].

Dentro de las recomendaciones consideramos que es necesario realizar estudios más detallados sobre éstos enzimas, por medio de la determinación de parámetros cinéticos que aporten mayor información. De igual manera es importante avanzar en estudios de purificación y determinación de la estructura del enzima, así como la funcionalidad de ésta con otros sustratos e inhibidores. Será importante también determinar la calidad nutricional del alimento luego de procesado a mediano y largo plazo.

#### 4 . BIBLIOGRAFÍA

- [1] MAYER, A., Harel, E. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*. 1979, 18, 193-215.
- [2] VAUGHN, K. C.; Duke, S. O. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Planta*. 1984, 60, 106-112.
- [3] ESKIN, N. A. M. Biochemistry of food spoilage: enzymatic browning. In *Biochemistry of Foods*, 2nd ed.; Academic Press: New York, 1990; pp 401-432.
- (4) MAYER, A. M.; Harel, E. Polyphenoloxidases and their significance in fruits and vegetables. In *Food*

enzymology; Fox, P. F., Ed.; Elsevier Applied Science: London, U.K., 1991; pp 373-398.

- [5] LEE, C., Whitaker, J. Enzymatic browning and its prevention. ACS Symposium Series 600, American Chemical Society. Washington, D. C. 1995.
- [6] ESPINAL, C. F., Martínez, H. J., Peña, Y. La Cadena de los Frutales de Exportación en Colombia. Una Mirada Global de su Estructura y Dinámica, 1991-2005. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Santafé de Bogotá. Marzo. 2005.
- [7] DOGAN, S., Turan, P., Dogan, M., Aíslan, O., Alkan, M. Purification and Characterization of *Ocimum basilicum* L. Polyphenol Oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 10224-10230.
- [8] ROCHA, A. M. C. N., and Morais, A. M. M. B. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from *Jonagored* apple. *Food Control*. 2001, 12(2), 85–90.
- [9] CARBONARO, C., & Mattera, M. Polyphenoloxidase activity and polyphenol levels in organically and conventionally grown peach (*Prunus persica* L., cv, Regina bianca) and pear (*Pyrus communis* L., cv, Williams). *Food Chemistry*. 2001, 72(4), 419–424.
- [10] NAKAMURA, N., Hayashi, N., Yang, C. P., Fujita, S., Ashrafuzzaman, M. A. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 2000, 48, 2732–2735.
- [11] GÓMEZ-LÓPEZ, V. M. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado. *Food Chemistry*. 2002, 77, 163–169.