

APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA INFRARROJA EN LA REACCIÓN DE LA POLIFENOL OXIDASA Y CATECOL

J. Hugo Castorena-García, Marlon Rojas-López, María Reyna Robles-López, Raul Delgado-Macuil, Raúl René Robles de la Torre, CIBA-IPN, Km 1.5 Carretera Tecuexcomac-Tepetila, 90600, Tlaxcala. Tel 01 248 4 87 07 65, fax, 01 248 4 87 07 66. marlonrl@yahoo.com.mx.

Palabras clave: polifenol oxidasa, espectroscopia infrarroja, catecol.

Introducción. La polifenol oxidasa (PFO) es una enzima ampliamente distribuida en el reino vegetal y cataliza dos reacciones diferentes: la hidroxilación de monofenoles (actividad monofenolasa) y la oxidación de los o-difenoles a o-quinonas (actividad difenolasa). Las o-quinonas son posteriormente polimerizada para formar pigmentos color café, rojo o negro (1). La PFO ha sido objeto de estudio durante varios años debido a que el oscurecimiento enzimático en frutas y vegetales produce una apariencia desagradable y la pérdida de sus atributos de calidad. Prevenir esta reacción ha significado un reto muy importante para científicos del área de los alimentos (2). Un sustrato ampliamente utilizado para el estudio de la enzima y sus reacciones es el catecol, el cual también está presente en muchos vegetales, entre ellos el aguacate (3). La espectroscopia IR ha mostrado ser una valiosa herramienta en el análisis de estructuras y cambios estructurales de moléculas biológicas, tanto a nivel de composición como dinámico. El objetivo de este trabajo es la detección y caracterización cinética de la reacción de PFO y catecol, empleando espectroscopia infrarroja en modalidad de reflexión total atenuada (ATR-FTIR) como método de análisis.

Metodología. Se empleó la PFO de SIGMA (T3824-50KU, tyrosinase-mushrom) la cual se diluyó a 0.1 mg/ml en bufer de fosfatos (HYCEL cat 21231, pH = 7) y Catechol (SIGMA cat 135011) este se diluyó a 120 mM en bufer Triz-HCl 0.1M y pH 7.1. Para el análisis de espectroscopia en IR se utilizó un equipo con transformada de Fourier (FT-IR) marca Bruker Modelo Vertex-70 con la técnica de Reflectividad Total Atenuada (ATR) en el rango 400 - 4000 cm^{-1} .

Resultados y discusión. La figura 1 muestra los espectros ATR-FTIR correspondientes a la absorción infrarroja del catecol durante el proceso de oxidación por la PFO. Es notable la presencia de bandas IR asociadas a vibraciones moleculares características tanto del sustrato como de la enzima durante la reacción. Como ejemplo se observa el aumento en la intensidad de la banda centrada en 1262 cm^{-1} asociada a un aumento en el número de enlaces tipo *random coil* en la estructura de la PFO (4). La figura 2 muestra los espectros ATR-FTIR de catecol y catecol oxidado por PFO después de haber transcurrido algunas horas. Es notable la reducción en intensidad de algunas de las principales bandas IR de catecol, lo cual sugiere la formación gradual de o-quinonas como resultado de la reacción.

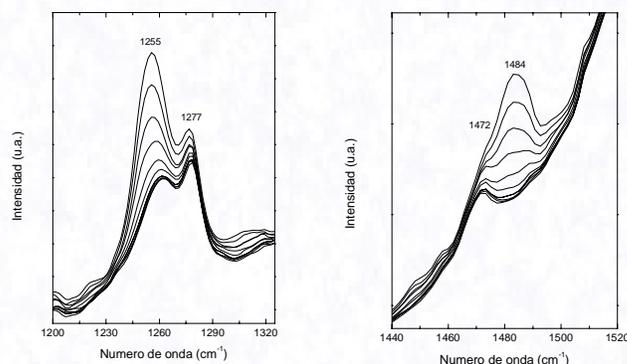


Fig. 1. Espectros ATR-FTIR obtenidos durante el proceso de oxidación de catecol por la polifenol oxidasa en solución.

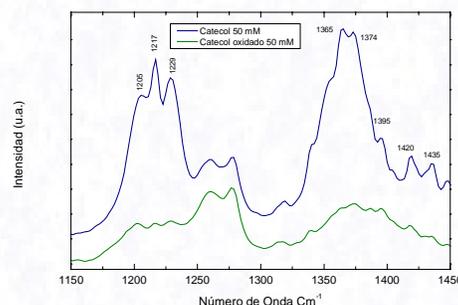


Fig. 2. Espectros ATR-FTIR de catecol y catecol oxidado por PFO.

Conclusiones. Mediante el empleo de la técnica de análisis ATR-FTIR fue posible caracterizar la reacción cinética de la PFO y catecol, observándose cambios en la intensidad en algunas de las principales bandas IR asociadas tanto a la presencia de la molécula de catecol como de la de PFO.

Agradecimiento. Los autores agradecen al CONACYT-FOMIX Michoacán Proyecto 2005-C01-015 y proyecto SIP20071032.

Bibliografía.

- Mason, H. (1955). Comparative biochemistry of the phenolase complex. *Adv. Enzymol.* 16, 105-184.
- Matheis, G. (1987). Polifenol oxidase and enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*). *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 11, 5-12.
- V.M. Gomes-López, (2002), Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado. *Food Chem.* 77, 163-169.
- Shi, C. (2003), The FTIR spectrometric analysis of the changes of PPO II secondary structure. *J. Molec. Struct.* 644, 139-144.