

## EFFECTO INHIBITORIO DE POLIFENOLES NATURALES Y SINTÉTICOS EN LA ACTIVIDAD DE LIPOXIGENASA CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Analía Medina<sup>1</sup>; Lucrecia Chaillou<sup>1</sup>; Mónica Nazareno<sup>1,2</sup>

(1) Laboratorio de Antioxidantes y Procesos Oxidativos. Instituto de Ciencias Químicas, Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional de Sgo. del Estero. (2)CITSE-CONICET-UNSE. Veromedina83@hotmail.com

### Introducción

Las lipoxigenasas (LOX) constituyen una familia heterogénea de enzimas ampliamente distribuidas en vegetales, mamíferos, peces, hongos, algas y bacterias. Estas dioxigenasas, que pertenecen al grupo de las oxidorreductasas, son proteínas monoméricas de aproximadamente 95-100 kDa, que poseen dos dominios: el amino-terminal de aproximadamente 25-30 kDa de estructura de lámina  $\beta$  y el carboxi-terminal de 55 a 65 kDa que se compone principalmente de  $\alpha$ -hélices y alberga el sitio catalítico de la enzima (Andreou et al., 2009).

Estas enzimas catalizan la reacción inicial de oxidación de ácidos grasos insaturados, que contienen uno o más sistemas 1,4-Z,Z-pentadieno, en presencia de oxígeno molecular, formando como productos primarios, hidroperóxidos con sistemas diénicos conjugados (Liavonchanka y Feussner, 2006). Debido a que estas enzimas están presentes en alimentos tales como cereales, oleaginosas, hortalizas, frutas, etc., y participan en procesos oxidativos alimentarios, vinculados al deterioro de la calidad organoléptica y nutricional, se han desarrollado diversos procesos tecnológicos a los fines de modular su actividad (Yoshie-Stark y Wäsche, 2004). Su actividad prooxidante puede ser disminuida o inhibida por polifenoles. En las células de organismos vivos, las LOX se encuentran comúnmente en la superficie de las membranas biológicas o dentro de ellos como proteínas extrínsecas; por lo tanto, con frecuencia ejercen su función en diferentes entornos microheterogéneos. Con el fin de estudiar la actividad catalítica *in vitro* de las enzimas, se simulan estos microambientes utilizando sistemas micelares. Estos están constituidos por surfactantes en solución acuosa, formando micelas directas, o en solventes orgánicos formando micelas inversas (Ono, y Goto, 2006).

Los objetivos de este trabajo fueron: determinar el efecto inhibitorio del ácido gálico y compararlo con el de otros antioxidantes de origen natural y sintético sobre la actividad de lipoxigenasa aislada de porotos de soja; calcular los parámetros cinéticos y establecer el tipo de inhibición ejercida por estos polifenoles.

### Materiales y Métodos

#### Aislamiento de LOX de soja

Se trituraron porotos de soja con 50 ml de agua ultra pura; se precipitaron compuestos fenólicos y proteínas de almacenamiento. La mezcla se centrifugó a 12.000 g por 10 min, utilizándose el sobrenadante para las determinaciones de actividad.

#### Actividad enzimática

La actividad catalítica se determinó en función de la formación de hidroperóxidos conjugados resultantes de la oxidación de ácido linoleico (AL), midiendo para ello la absorbancia, a 234 nm en 10 ciclos cada 20 s. Una unidad de actividad se define como la cantidad que causa un incremento en absorbancia de 0,001 UA/min a 25 °C en un volumen de 3 ml para 1 cm de paso óptico.

## Actividad enzimática de LOX en micelas inversas

Se prepararon micelas inversas de AOT en iso-octano a una relación molar entre agua y surfactante,  $W=62$ , analizándose a 25°C y pH 10 por triplicado, una serie de concentraciones de ácido linoleico (216-1250  $\mu\text{M}$ ), ácido gálico (AG) (5-100  $\mu\text{M}$ ), quercetina (5-10  $\mu\text{M}$ ), ácido sinápico (5-30  $\mu\text{M}$ ) y galato de propilo (2- 40  $\mu\text{M}$ ).

## Parámetros cinéticos

Los datos se ajustaron al modelo de Michaelis–Menten, a partir del cual se determinaron los parámetros cinéticos.

Las determinaciones se realizaron por triplicado a 25 °C

## Resultados

En la Fig. 1 se muestra la cinética de la reacción de oxidación de AL inducida por LOX, realizando el ajuste con el modelo de **Michaelis-Menten**, a partir de la cual se determinaron los parámetros cinéticos característicos.

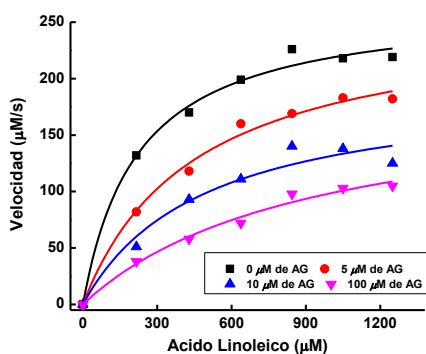


Fig. 1. Actividad de LOX en micelas inversas de AOT/iso-octano de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten, en ausencia y presencia de AG como Inhibidor

La interacción entre las moléculas de polifenol y LOX se puede observar en el espectro de absorción. A modo de ejemplo, en la Fig. 2 se presenta el espectro de absorción de quercetina. La absorbancia de los picos 1 y 3 ( $\lambda= 270$  y 396 nm) disminuyen mientras que la del pico 2 ( $\lambda= 324$  nm) se incrementa con la alícuota de enzima.

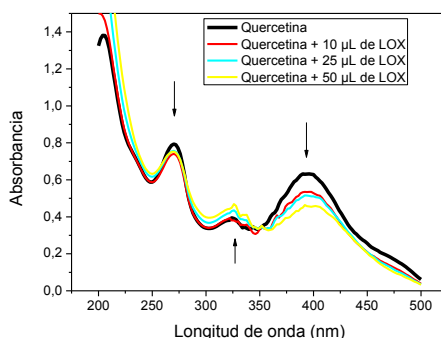


Fig. 2. Espectros de absorción de quercetina en presencia y ausencia de LOX

En la Tabla 1 se muestran los valores de los parámetros cinéticos en ausencia y presencia del inhibidor, observándose que el antioxidante reduce de manera efectiva la velocidad máxima aparente. El efecto sobre  $K_m$  se evidencia en un aumento de su valor.

**Tabla 1.** Parámetros cinéticos de la actividad de LOX en Micelas inversas, con y sin inhibidor

Antioxidantes	Parámetros Cinéticos	
	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\text{máx}}$ [nM/s]
Sin inhibidor	222 $\pm$ 41	267 $\pm$ 13
Ácido sinápico (5 $\mu\text{M}$ )	277 $\pm$ 43	217 $\pm$ 12
Quercetina (10 $\mu\text{M}$ )	481 $\pm$ 127	101 $\pm$ 10
Galato de Propilo (20 $\mu\text{M}$ )	508 $\pm$ 182	215 $\pm$ 31
Ácido Gálico (100 $\mu\text{M}$ )	445 $\pm$ 101	93 $\pm$ 19

La constante de disociación del complejo Enzima-Inhibidor,  $K_i$ , fue 3,7; 1,4; 2,1 y 10,9  $\mu\text{M}$  para ácido sinápico, quercetina, ácido gálico y galato de propilo, respectivamente.

Además, se determinó, en todos los casos estudiados, que el incremento de la concentración de antioxidante reduce la actividad enzimática. Los porcentajes de inhibición fueron de 45, 59, 70 y 72% para ácido gálico, sinápico, quercetina y galato de propilo, respectivamente.

### Conclusión

Los polifenoles estudiados presentaron distintos grados de inhibición de LOX. Además, la presencia del inhibidor afectó los parámetros cinéticos y la constante de disociación. En base a los resultados obtenidos se concluye que los antioxidantes se comportan como inhibidores No competitivos mixtos.

### Referencias

- Andreou, A., F. Brodhun, I. Feussner. 2009. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals, *Progress in Lipid Research*. 48, 148–70.
- Liavonchanka, A., I. Feussner. 2006. Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis, *Journal of Plant Physiology*. 163, 348-357.
- Yoshie-Stark, Y., A. Wäsche 2004. Characteristics of crude lipoxygenase from commercially de-oiled lupin flakes for different types of lupins, *Food Chemistry*. 88, 287-292.
- Ono, T., M. Goto. 2006. Peroxidative catalytic behavior of Cytochrome c solubilized in reverse micelles, *Biochemical Engineering Journal*. 28, 156–160.