

6  
2ejº



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“ ESTUDIO CINÉTICO DE LA OXIDACIÓN  
ENZIMÁTICA DE LOS POLIFENÓLOS DEL FRUTO  
DEL AGUACATE  
(Persea americana, variedad Hass)”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
Q U Í M I C O**

**P R E S E N T A:**

**RODRIGO TARKUS PATIÑO DÍAZ**

**ASESOR;**

**Q. YOLANDA MARINA VARGAS RODRIGUEZ**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.**

**1996**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

DR. JAIKE KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Estudio Clínico de la Guadación Enzimática de los  
Polifenoles del Fruto del Aguacate (Persea americana,  
variedad Hass)."

que presenta el pasante: Rodrigo Torres Patiño Díaz  
con número de cuenta: 980067145 para obtener el TITULO de:  
Químico

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 08 de Marzo de 19996

PRESIDENTE	<u>M. en I. Guillermo Rodríguez Romero</u>	
VOCAL	<u>D. Yolanda María Vargas Rodríguez</u>	
SECRETARIO	<u>D. Arcadio Hernández Beltrán</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>A. Juan Bernal Ace</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>L.A. Andrés Bernal Beltrán</u>	

## DEDICATORIA

A mi tierra mexicana, tan llena de  
sangre, lágrimas y esperanza.

A la memoria de mis abuelos,  
David Patiño Allen y  
Hermenegildo Díaz Piña.

A mis abuelas (mis raíces),  
Clara González de Arce Pasalagüa  
y Ernestina López Nochebuena.

A los verdaderos científicos y artistas.

## RECONOCIMIENTOS

Apreciaré siempre la ayuda que recibí para la elaboración de este trabajo de parte de las siguientes personas.

De mis padres, David y Magdalena, por su apoyo incondicional, comprensión y cariño:

De mi asesora, Marina Vargas, por su valiosa orientación y por su confianza.

De los demás miembros del honorable jurado, Guillermo Rodríguez, Arcadia Hernández, Sonia Rincón y Guadalupe Franco, por sus acertados comentarios.

De Víctor Manuel González, Luis Alfonso Torres, Myriam Campos y Genaro, por su invaluable cooperatividad.

De Elia Catalina León, Victoria Hernández y Porfirio Estrada, por sus amables atenciones.

De mis amigas Verónica Altamirano, Marisol Güizado y Yenelli Ruíz, por sus oídos, sus ideas y sus actos; por su cariño y apoyo.

De Adriana Rodríguez, por todo y nada.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, mi principio y fin.  
A mi familia total, diversa, compleja.  
A mis amigos y amigas de toda la vida.  
A mis compañeros escolares.  
Al mundo que me rodea.

A todos los profesores que, buenos o malos, me dejaron algo que aprender. Recuerdo claramente a Miss Linda del jardín de niños. A Homero, Sara, Araceli, Leonor y Guadalupe Chávez, de la escuela primaria. A Yolanda, Salomé, Josefina "la tiburona", "La loca", "La pasita", Huicochea, Xóchitl, Rosa Elba Huitrón, "El pelón", Gilberto, Porfirio Guadarrama, Tirzo, Ariel, Bárcenas, Humberto, Pascual, Antolín, Zavala y Tito, de la secundaria. A Leticia Cevallos, Olivia Rodríguez, Jesús Maza, Víctor Díaz, Noemí Recio, Guillermo González, Alfonso Zarco, Héctor García, Abel García, Guadalupe Ferrer, Ana Luisa Arvizu, Amalia García, Cirilo Sánchez, José Rodríguez, José Ángel Hernández, Verónica Hernández, Miguel Fuentes, María Antonieta, Rosalinda Ayala y Dora Luz Cisneros, del CCH Naucalpan. A aquellos que he olvidado ya.

A los profesores de mi querida facultad. A Fernando Colmenares, José Proal, Marina Vargas, Guadalupe Franco, Graciela Martínez y Susana Alcántara. A Carlos Galán, Cecilia González, Guadalupe Pérez, Sonia Rincón, Delia Reyes, Alberto Rojas, Franco Pérez y Enrique Rodríguez. A Roberto Andrade, Natividad Venegas, Araceli Amador, Ofelia Vega y Bertha Rodríguez. A Georgina Espinoza, Virginia Benítez, Jaime Mondragón, Gabriel y Rocío, Francisco Delgado, Brígida Camacho, René Miranda, Enrique Ángeles y Rosario Ruz. A Arturo Robles, Guillermo Vázquez, Jaime Rodríguez, Genaro Rojas, Gilberto Amaya, Ana Leticia Fernández y Ramón Fuentes. A Ramón González, Guillermo Calderón, Araceli, José Luis López, Héctor Coss y Antonio Trejo. A Arcadia Hernández, Gabriela Escalante, Carolina Moreno y Andrea Becerril. A Gerardo Sánchez, Adolfo Obaya y Luz María Pineda. A Vicky, Elia y Porfirio.

## INTRODUCCIÓN

El aguacate es un árbol originario de México cuyo fruto ha sido un manjar durante siglos y actualmente existen numerosas variedades que se cosechan con éxito en diversos países del mundo. La variedad Hass ha alcanzado actualmente una gran difusión a nivel mundial por su excelente calidad y en nuestro país es la más cultivada, siendo muy resistente al ataque de plagas y enfermedades.

El fruto del aguacate es susceptible a diversos cambios fisiológicos que decrecen su aceptabilidad en el mercado. Estos problemas se acentúan por numerosos factores propios de su comercialización: la cosecha, la maduración, el transporte y la conservación en mostradores que, con el paso del tiempo, minimizan la calidad del producto. Existen varios estudios encaminados a la resolución de estos obstáculos.

Una propuesta interesante a tan complejo reto es procesar el fruto del aguacate. Para ésto, quizá lo más grave a vencer es el oscurecimiento de su pulpa, debido principalmente a la oxidación enzimática de los fenoles contenidos. Tal oxidación se lleva a cabo en presencia del oxígeno atmosférico y es la primera de una serie de reacciones secundarias que finalmente conducen al oscurecimiento de los tejidos del fruto.

Para poder controlar el proceso es necesario hacer primeramente un estudio cinético de la reacción, con la finalidad de proponer condiciones e inhibidores efectivos, aplicables en el procesado de la pulpa de aguacate. Aunque existen algunos trabajos reportados sobre estudios de la oxidación enzimática en aguacates, ninguno presenta resultados para la variedad Hass. El presente trabajo es una primera contribución al estudio cinético de la acción de la enzima polifenoloxidasas, extraída de aguacates de variedad Hass, sobre fenoles presentes en el fruto.

Los fenoles que se hicieron reaccionar con la enzima fueron catecol, 4-metilcatecol, dopamina y pirogalol, sustancias cuya existencia en la pulpa de aguacate se ha demostrado. En la tabla 0 se encuentran los valores encontrados de la constante de Michaelis,  $K_m$ , para cada fenol.

Se probó el efecto del pH en la actividad enzimática, encontrándose un valor de 7.0 como el óptimo para la oxidación. Se estudió también el efecto de la presencia de cloruro de sodio en la solución de reacción, encontrándose que la actividad enzimática aumenta con respecto de la concentración de cloruro de sodio.

Finalmente se trabajó la oxidación enzimática a diferentes valores de temperatura, encontrándose una temperatura óptima de 50°C. En la tabla 0 se tienen los valores de energía de activación obtenidos para las reacciones con los diferentes fenoles.

Tabla 0. Parámetros cinéticos para la oxidación de los fenoles estudiados por acción de la enzima polifenoloxidasas.

FENOL	$K_m$ (mM)	$E_a$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )
CATECOL	6.8	33
4-METILCATECOL	11	14
DOPAMINA	19	40
PIROGALOL	41	47



# OBJETIVOS

## **OBJETIVO GENERAL**

Realizar el estudio cinético de la oxidación de los fenoles catecol, 4-metilcatecol, dopamina y pirogalol, presentes en la pulpa de aguacate, por acción de la enzima polifenoloxidasas extraída de aguacates de la variedad Hass.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Efectuar la extracción de la enzima polifenoloxidasas de la pulpa del aguacate de la variedad Hass y purificarla parcialmente.

Encontrar la relación entre la concentración inicial de sustrato y la velocidad inicial de la reacción de oxidación enzimática con cada uno de los fenoles listados anteriormente.

Determinar las velocidades de reacción a diferentes valores de pH para los cuatro fenoles oxidados por la enzima polifenoloxidasas.

Señalar la influencia de la concentración salina sobre la velocidad de la reacción de oxidación de los fenoles en estudio.

Conocer el efecto de la temperatura en la velocidad de la reacción enzimática con los fenoles de trabajo.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	v
OBJETIVOS	vii

### I. GENERALIDADES

#### *1.1 El aguacate.*

1.1.1 Origen y diversidad.	1
1.1.2 Composición y valor nutritivo.	2
1.1.3 Maduración.	5

#### *1.2 Enzimas.*

1.2.1 Historia de la enzimología.	6
1.2.2 Nomenclatura y clasificación	6
1.2.3 Estructura química.	7
1.2.4 Sitio activo.	9
1.2.5 Especificidad enzimática.	10
1.2.6 Cinética y termodinámica de la catálisis enzimática.	10
1.2.7 Extracción.	11
1.2.8 Purificación.	12
1.2.8.1 Precipitación por solventes orgánicos.	
1.2.8.2 "Salting-out" de proteínas.	
1.2.8.3 Desnaturalización selectiva.	
1.2.8.4 Cromatografía y electroforesis.	
1.2.8.5 Cristalización.	
1.2.8.6 Criterios de pureza	
1.2.9 Cuantificación de proteínas.	15
1.2.9.1 El método Kjeldahl.	
1.2.9.2 Absorción ultravioleta.	
1.2.9.3 Método del biuret.	
1.2.9.4 Método de Folin-Lowry.	
1.2.9.5 Método de Bradford.	

<i>1.3 Cinética química.</i>	
1.3.1 Cinética.	18
1.3.2 Velocidad de reacción.	19
1.3.3 Orden de reacción.	19
1.3.4 Factores que afectan la velocidad de reacción.	21
1.3.5 La influencia de la temperatura en la velocidad de reacción.	22
1.3.6 Catalizadores.	23
<i>1.4 Cinética enzimática.</i>	
1.4.1 Actividad enzimática.	24
1.4.2 Modelo de Michaelis-Menten.	25
1.4.3 Incompatibilidad de la teoría de Michaelis-Menten.	29
1.4.4 Tratamientos de la ecuación de Michaelis.	30
1.4.5 Efecto de la temperatura.	31
1.4.6 Efecto del pH.	31
1.4.7 Activación e inhibición.	32

## II. ANTECEDENTES

<i>2.1 Polifenoloxidasas.</i>	
2.1.1 Generalidades.	34
2.1.2 Reacciones de hidroxilación.	35
2.1.3 Oxidación de o-difenoles.	36
2.1.4 Modificaciones de la actividad de la polifenoloxidasas.	38
<i>2.2 Cinética de reacción de las polifenoloxidasas.</i>	
2.2.1 Medidas de la actividad de la catecolasa.	39
2.2.2 Métodos para la determinación de actividades.	40
2.2.3 Actividad en la naturaleza.	40
<i>2.3 Polifenoloxidasas en el aguacate.</i>	
2.3.1 Isoenzimas.	42
2.3.2 Extracción.	42
2.3.3 Purificación.	43
2.3.4 Actividad enzimática.	44
2.3.5 Inhibición de la enzima.	45

### III. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

3.1 <i>Material y equipo.</i>	46
3.2 <i>Reactivos.</i>	46
3.3 <i>Experimentación.</i>	
3.3.1 <i>Madurez de los aguacates utilizados.</i>	47
3.3.2 <i>Extracción y purificación parcial de la enzima.</i>	47
3.3.3 <i>Determinación de la actividad enzimática de la polifenoloxidasas.</i>	49
3.3.4.1 <i>Medidas a diferentes concentraciones iniciales de sustrato.</i>	
3.3.4.2 <i>Influencia del pH.</i>	
3.3.4.3 <i>Influencia de la fuerza iónica.</i>	
3.3.4.4 <i>Influencia de la temperatura.</i>	

### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 <i>Madurez de los aguacates utilizados.</i>	52
4.2 <i>Extracción y purificación parcial de la enzima.</i>	52
4.3 <i>Determinación de la actividad enzimática de la polifenoloxidasas.</i>	
4.3.1 <i>Medidas a diferentes concentraciones iniciales de sustrato.</i>	54
4.3.2 <i>Influencia del pH.</i>	61
4.3.3 <i>Influencia de la fuerza iónica.</i>	65
4.3.4 <i>Influencia de la temperatura.</i>	69
4.4 <i>Alcances y perspectivas.</i>	75

V. CONCLUSIONES	76
-----------------	----

REFERENCIAS	77
-------------	----

ANEXO	81
-------	----

# I. GENERALIDADES

## 1.1 El aguacate.

### 1.1.1 Origen y diversidad.

El fruto del árbol del aguacate<sup>1</sup> (*palta, zaboca, butter pear, alligator pear*) cuyo origen etimológico es la voz náhuatl *ahuácatl*, era un manjar ya conocido por las antiguas poblaciones indígenas de América. Es originario del sur de México y de América Central, pero en la actualidad es común en una zona que abarca México y las Antillas y que llega hasta el sur de Brasil. Se cultiva además en los Estados Unidos, sobre todo en el estado de California, y en los países ribereños del Mediterráneo.

Los aguacates<sup>2</sup> fueron ampliamente cultivados en las regiones tropicales de América como árboles individuales antes de la conquista española, sin embargo, no recibieron una atención horticultora hasta principios del presente siglo. Los aguacates son muy populares en nuestro país, que produce grandes cantidades anualmente. Otras industrias florecientes del cultivo del aguacate se desarrollaron en Florida y California, en el sur de África y, en menor proporción, en Chile, Brasil, Hawái, Australia y algunas islas del Pacífico. También existen plantíos comerciales de aguacate desarrollados en Israel y en otros países alrededor del Mediterráneo.

El árbol<sup>2</sup> del aguacate (*Persea americana*) pertenece a la familia de las lauráceas. Es alto (puede llegar a alcanzar una altura de 15 metros<sup>1</sup>) y frondoso. Sus hojas son de color verde oscuro, con forma elíptica u ovalada y con 100 a 300 mm de largo. Las flores son pequeñas y de color verde amarillento, nacen en racimos densos y son carentes de pétalo.

La fruta del aguacate puede variar ampliamente en su forma, tamaño y color. La forma varía desde redonda hasta una forma de pera con un cuello largo y delgado. Su peso medio es de unos 300 ó 400 gramos, aunque existen variedades más pequeñas que un huevo de gallina o tan grandes con un peso de 1 o 2 kilogramos. A veces, la piel exterior es muy delgada y lisa, a veces es gruesa y con textura rugosa; el color de la piel varía de verde claro a verde oscuro, violeta o negro. La semilla, en general es grande y de color castaño, con dos cotiledones y de forma redonda a ovalada. La pulpa del aguacate es de color verde amarillento, con consistencia pastosa de mantequilla y con un sabor a nueces muy delicado y apreciado<sup>1,2</sup>.

Horticultóricamente<sup>2</sup>, los aguacates se dividen en las clases Mexicana, Guatemalteca y West Indian. La Mexicana, considerada por algunos botánicos como una especie distinta (*Persea drymifolia*) es nativa de México y se caracteriza por el olor a anís de sus hojas y por sus pequeñas frutas (90 a 240 gramos) de piel delgada, delicioso sabor y excelente calidad; es la más resistente y tiene gran valor en regiones muy frías para otros tipos. La clase Guatemalteca, nativa de las altas tierras de Centroamérica, es ligeramente menos resistente a las heladas y produce frutos de tamaño medio a grande (240 a 1000 gramos); se caracteriza por su piel gruesa y con textura áspera y una época de maduración diferente de la otras. La clase West Indian, la más tropical, se limita a los Estados Unidos en el sur de Florida.

Existen numerosas variedades comerciales de aguacates. Una de las más comunes en la región central de México es la variedad Hass, caracterizada por su tamaño medio (un peso entre los 200 y 400 gramos), su forma ovoide o aperada, su piel rugosa de color verde a negro y su gran calidad gustativa<sup>3</sup>.

### 1.1.2 Composición y valor nutritivo.

El aguacate tiene un contenido elevado de proteínas y grasa. En algunas variedades, la pulpa contiene tanto como el 25% de aceites insaturados.

También presenta una considerable riqueza en vitamina A y en diferentes factores del complejo B, como la tiamina y la riboflavina<sup>1,2</sup>.

La cantidad de agua en la pulpa puede variar del 50 al 80 % y el contenido de lípidos es de entre 10 y 40 %, incluso entre los frutos de un mismo árbol de aguacate<sup>4</sup>.

En la tabla A se muestra la composición promedio general encontrada en la pulpa de aguacate de las variedades Fuerte y Hass.

Tabla A. Composición promedio de 100 gramos de la pulpa de aguacate<sup>4</sup>.

VARIEDAD	Fuerte	Hass	Promedio
Valor energético, kcal	189	191	190
Contenido de agua, g	73.1	72.0	72.5
Nitrógeno total, g	0.34	0.26	0.30
Proteínas, g	2.1	1.6	1.9
Lípidos, g	19.3	19.7	19.5
Ácidos grasos totales, g	18.2	18.6	18.4
Saturados, g	3.5	4.7	4.1
Monoinsaturados, g	12.9	11.3	12.1
Poliinsaturados, g	1.8	2.6	2.2
Colesterol, g	0	0	0
Carbohidratos, g	1.9	1.9	1.9
Almidón, g	trazas	trazas	
Glucosa, g	0.3	0.3	0.3
Fructosa, g	0.1	0.2	0.1
Sacarosa, g	0.1	trazas	0.1
Fibra dietética, g	3.4	3.4	3.4
Celulosa, g	1.1	1.1	1.1
Polisacáridos varios, g	2.3	2.3	2.3
Lignina, g	0.2	0.2	0.2

Minerales			
Sodio, mg	9	3	6
Potasio, mg	430	470	450
Calcio, mg	11	11	11
Magnesio, mg	25	24	25
Fósforo, mg	43	35	39
Hierro, mg	0.4	0.4	0.4
Cobre, mg	0.35	trazas	0.19
Cinc, mg	0.6	0.2	0.4
Azufre, mg	19	19	19
Cloro, mg	9	3	6
Manganeso, mg	0.2	(0.1)	0.2
Selenio, mg	trazas	trazas	
Yodo, µg	2	(2)	2
Vitaminas y otros			
Caroteno, µg	16	16	16
α-Caroteno, µg	4	4	4
β-Caroteno, µg	14	14	14
Criptoxantinas, µg	trazas	trazas	
Retinol, µg	0	0	0
Vitamina D, µg	0	0	0
Vitamina E, mg	3.20	3.20	3.20
Tiamina, mg	0.12	0.08	0.10
Riboflavina, mg	0.19	0.17	0.18
Níacina, mg	1.0	1.2	1.1
Vitamina B <sub>6</sub> , mg	0.34	0.38	0.36
Folato, µg	13	8	11
Pantotenato, mg	1.10	1.10	1.10
Biotina, µg	3.6	3.6	3.6
Vitamina B <sub>12</sub> ,	0	0	0
Vitamina C, mg	5	7	6
Triptófano, mg	0.4	0.3	0.3
Ácido fólico, g	0.01	0.01	0.01

Nota: Los números entre paréntesis son valores estimados.



La vida de frutas y vegetales posterior a la germinación puede dividirse en tres estados fisiológicos importantes: crecimiento, maduración general y caducación<sup>5</sup>. El crecimiento involucra divisiones celulares y subsecuente aumento de células, redituando en el tamaño final del producto. La maduración general (*maturation*) generalmente comienza antes de que el crecimiento cese e incluye diferentes actividades, dependiendo de la especie de que se trate. Tanto el crecimiento como la maduración general son considerados como fase de desarrollo, y se llevan a cabo cuando el producto aún se encuentra en la planta.

La caducación se define como la etapa en la que los procesos bioquímicos anabólicos (de síntesis) dan paso a los procesos catabólicos (de degradación), produciendo envejecimiento y posterior muerte del tejido. En las frutas se considera un período extra de maduración particular (*ripening*), que se desarrolla entre las últimas fases de la maduración general y las primeras de caducación<sup>5</sup>.

La maduración particular de las frutas involucra numerosos cambios fisicoquímicos aún después de la cosecha, debido a muchos procesos que probablemente ocurren independientemente unos de otros<sup>5</sup>. Los cambios más comunes son en las velocidades de respiración y de producción de etileno, la permeabilidad de los tejidos y la composición general de los frutos.

El aguacate es un fruto cuyas características dependen ampliamente de los procesos de maduración. Han sido precisamente estos cambios las bases de diversos criterios en la determinación de su madurez óptima. Algunos de estos métodos<sup>6</sup> son las determinaciones de aceite, azúcares, proteínas o sólidos totales, el índice de refracción, el color, la textura y el sabor de la pulpa. Existen además algunos métodos de determinación de madurez en aguacates que procuran no destruir las muestras y están basados en los cambios eléctricos de la pulpa. Estos se refieren a mediciones de impedancia<sup>7,8</sup> y conductividad<sup>6,9</sup> de la pulpa. Tales mediciones evolucionan durante la maduración del aguacate y se han relacionado con los cambios en la permeabilidad de las membranas celulares<sup>7</sup> y los cambios en su respiración<sup>6</sup>.

### 1.2.1 Historia de la enzimología.

La enzimología es la ciencia que se refiere al estudio de la estructura y el funcionamiento de las enzimas. Esta ciencia reviste un especial interés en el fenómeno biológico, pues se sabe que la vida de una célula depende de un complejo conjunto de reacciones químicas catalizadas por enzimas específicas<sup>10</sup>.

En la primera mitad del siglo pasado fueron descubiertas las primeras enzimas. Pero no fue sino hasta después de casi un siglo que se demostró que las enzimas son proteínas. A partir de entonces, las investigaciones con respecto a las enzimas se intensificaron, lo que permitió descubrir y purificar un considerable número de enzimas, e incluso cristalizar algunas de éstas<sup>11</sup>.

El avance logrado dio lugar a un mayor estudio en el área de la caracterización química de las enzimas, profundizando en la secuencia de aminoácidos que las constituyen. Posteriormente se hicieron varios descubrimientos en el campo de la cinética enzimática, intercambio de moléculas y caracteres termodinámicos del proceso, permitiendo comprender algunas de las características fundamentales de la acción enzimática<sup>10,11</sup>.

### 1.2.2 Nomenclatura y clasificación.

Existe una clasificación sistemática de enzimas (EC) que se ha adoptado bajo la recomendación de una comisión internacional. Con este sistema las enzimas se dividen en seis clases principales, cada una con varios subgrupos, de acuerdo con el tipo de reacción catalizada<sup>11</sup>.

Existen entonces enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción (1.Óxido-reductasas), reacciones de transferencia de grupos funcionales (2.Transferasas), reacciones de hidrólisis (3.Hidrolasas), reacciones de adición a dobles enlaces (4.Liasas), reacciones de isomerización (5.Isomerasas) y reacciones de formación de enlaces con participación de ATP (6.Ligasas)<sup>11</sup>.

Con la clasificación descrita, cada enzima tiene un nombre recomendado (generalmente corto y de uso común), un nombre sistemático (que expresa la reacción catalizada) y un número de clasificación exclusivo que la diferencia de cualquier otra enzima.

### 1.2.3 Estructura química.

En la estructura molecular de las proteínas se consideran diferentes niveles de organización: estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. Se denomina estructura primaria a la secuencia de aminoácidos que constituye la cadena peptídica, es decir, el orden en que éstos están colocados en una cadena, controlado de forma genética<sup>10</sup>.

La estructura secundaria, considerada como el grado de torsión que existe en la cadena peptídica, depende también del tipo y de la secuencia de los aminoácidos que la constituyen. A partir de patrones de difracción de Rayos X, se han descrito dos tipos de estructuras secundarias de las proteínas:  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -configuración de hoja plegada. La  $\alpha$ -hélice es la forma más abundante y consiste en la formación de una hélice torcida hacia la derecha de la cadena que contiene 3.6 residuos de aminoácidos por cada vuelta, y que se estabiliza por la unión de puentes de hidrógeno entre los grupos amino y carbonilo de los aminoácidos de la cadena peptídica. La  $\beta$ -configuración, con forma de hoja plegada, también se estabiliza por puentes de hidrógeno entre residuos de grupos amino y carbonilo pero de secciones distintas de la cadena que se acomodan lado a lado de forma paralela o antiparalela<sup>11,12</sup>.

La cadena peptídica, a su vez, se dobla varias veces sobre sí misma, estableciendo así la estructura tridimensional o estructura terciaria de la proteína. Esta estructura es de vital importancia para la acción catalítica de las enzimas, ya que es la que determina la configuración de la molécula y, por tanto, la posibilidad de unión a través de diversos puntos de contacto de la enzima (sitio activo) con el sustrato<sup>11</sup>. Las posiciones relativas de ambas moléculas deben ser precisas para permitir su acercamiento y unión. Los cambios de distancia entre los residuos químicos de los aminoácidos del sitio activo de la enzima causan la pérdida parcial o total de la actividad catalítica de las enzimas<sup>13</sup>.

Existen ciertos agentes como la temperatura, la fuerza iónica, el pH y algunos compuestos que pueden causar la destrucción de la estructura terciaria, provocando la desnaturalización de las enzimas y la consecuente desactivación de su poder catalítico. En ocasiones, el proceso puede ser revertido, aparentemente, a través de un proceso termodinámico de doblamiento espontáneo que permite la renaturalización de las moléculas proteicas<sup>11</sup>.

El proceso de reestructuración de las enzimas ha sido interpretado como una reducción de la energía libre (de Gibbs) del sistema, lo que indica que los grupos hidrófobos de la molécula peptídica tienden a organizarse hacia la parte interna de la estructura formando el centro de la proteína. Simultáneamente, los pares iónicos y los puentes de hidrógeno se forman entre las cadenas peptídicas y, como consecuencia, la superficie molecular sufre una reducción considerable. Sin embargo, esta organización en las proteínas no conduce a una estructura rígida; por el contrario, sumamente adaptable, especialmente a los cambios del medio en que se encuentra y al proceso de la catálisis<sup>14,15</sup>.

Existen enzimas compuestas por más de una cadena peptídica. La unión entre dos o más cadenas peptídicas para integrar una molécula de enzima polimérica se conoce como la estructura cuaternaria de la proteína. Este término denota, por tanto, la existencia de subunidades en la molécula y establece un nivel superior de organización. Dicha estructura favorece la operación de mecanismos muy precisos en la acción enzimática, conocidos como mecanismos de regulación alostérica. Dichos mecanismos involucran una serie de reacciones secuenciales que se catalizan por un grupo de

enzimas unidas en estructura cuaternaria; el producto final tiene la capacidad de regular la acción de una de las primeras enzimas de la serie, llamada enzima alostérica<sup>11</sup>.

#### 1.2.4 Sitio activo.

Los hallazgos en cuestión de la estructura química de las enzimas llevaron a la postulación de la existencia de un sitio físico en su estructura molecular en donde se lleva a cabo la catálisis. La hipótesis se vio reforzada con los resultados de los estudios cinéticos en relación con el cambio de concentración de sustrato(s), y con la frecuente observación de que el sustrato protege a la enzima de la desnaturalización. Actualmente la hipótesis ha sido ampliamente confirmada y al lugar específico de unión y reacción de la enzima se le denomina sitio activo, compuesto por los residuos de los aminoácidos de la cadena peptídica que participan directamente en la catálisis<sup>10</sup>.

En un principio se consideraba que el sitio activo de la enzima formaba parte intrínseca de la molécula de proteína, que hacía las veces de marco rígido de dicha estructura y que era complementario al sustrato en cuanto a forma, tamaño y estructura química. Este modelo de llave-cerradura, fue muy popular durante varios años, pero no concuerda totalmente con la realidad<sup>10</sup>.

Más tarde se propuso la teoría del acoplamiento inducido, que sustenta la combinación de la enzima con ligandos pequeños, produciendo cambios de conformación en la proteína. Cuando el ligando corresponde al sustrato, estos cambios estructurales conducen a la orientación y a la ubicación adecuada de los grupos catalíticos de la proteína y se genera el sitio activo de la enzima. Una vez terminada la reacción, los productos se disocian de la enzima y ésta regresa a su estado originario<sup>10,16</sup>.

Esta teoría se ha confirmado por estudios en Rayos X<sup>17</sup>, así como por los descubrimientos relacionados con la regulación alostérica de las enzimas<sup>18</sup>. El término alosterismo se usó inicialmente para explicar la inhibición competitiva de una reacción enzimática causada por sustancias

estructuralmente parecidas al sustrato. El inhibidor de la reacción enzimática se une a la enzima en otro sitio de la molécula proteica diferente al sitio activo, causando a distancia una modificación de conformación de la proteína que altera la unión del sustrato con la enzima. De esta manera, se pueden explicar modulaciones en la velocidad de las reacciones enzimáticas tanto positivas (activación) como negativas (inhibición). Se puede considerar además el fenómeno de cooperatividad, es decir, el facilitamiento o impedimento de la unión de una segunda molécula de sustrato causado por la presencia de una primera molécula.

### 1.2.5 Especificidad enzimática.

Una de las características más sobresalientes de la catálisis enzimática es el alto grado de especificidad de la enzima por los sustratos de la reacción. Esta especificidad se limita a una sola molécula (especificidad absoluta) o a un rango muy restringido de sustancias químicas relacionadas con ella (especificidad relativa). Los diferentes grupos de enzimas varían mucho su grado de especificidad según sean los sustratos de la reacción<sup>11</sup>.

Existe además una notoria estereoespecificidad en las enzimas que incluye la capacidad de distinguir isómeros ópticamente activos. Esta observación conduce a asegurar que la unión de la enzima con el sustrato requiere de la participación de un mínimo de tres grupos residuales de la cadena peptídica para la debida orientación del sustrato<sup>10</sup>.

### 1.2.6 Cinética y termodinámica de la catálisis enzimática.

Una manera de incrementar la velocidad de una reacción es mediante el aumento de la temperatura del sistema para incrementar la energía de movimiento de las moléculas. Sin embargo, la vida existe en un rango limitado de temperaturas y muchas reacciones biológicas serían muy lentas

sin la presencia de enzimas que, como catalizadores que son, disminuyen específicamente la barrera de la energía de activación de tales reacciones. Algunos estudios han explicado parcialmente que esta disminución de la energía libre del complejo de transición enzima-sustrato se debe a un cambio importante en la entropía de dicho complejo<sup>10,11</sup>.

Existen varios factores que tienden a determinar el aumento en la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente. Uno de los más importantes es la acción concertada de más de un grupo químico en la catálisis. Los residuos de aminoácidos del sitio activo se encuentran en posiciones estratégicas que permiten un paso concertado, proceso más rápido que en uno en el que cada grupo actúa de forma independiente y secuencial<sup>10</sup>.

Además, el efecto combinado de multisitios de unión de la enzima y el sustrato, así como la unión precisa de éste dentro del sitio activo, tienden a restringir la libertad de movimiento del sustrato y lo confinan en una posición única. Como consecuencia, existe una gran concentración de complejos enzima-sustrato efectivos que dan lugar a la formación del producto<sup>10</sup>.

### 1.2.7 Extracción.

En general, para el estudio de alguna enzima, es necesario extraerla de la fuente natural y purificarla de acuerdo con el grado de estudio que se le quiera hacer. En la mayoría de los casos será necesario llevar a cabo la ruptura de la membrana celular dentro de la cual se encuentra la enzima. En las células vegetales, la presencia de una pared celular resistente hace más difícil la ruptura. Existe además un proceso especial que requiere de una combinación de métodos cuando las enzimas se encuentran asociadas a organelos subcelulares<sup>10</sup>.

Algunos métodos para romper la membrana celular son mecánicos, que involucran molinos de arena, licuadoras, prensas de alta presión, agitación a alta velocidad con perlas de vidrio y oscilaciones sónicas o ultrasónicas. Los métodos físicos se relacionan con tratamientos térmicos y shocks osmóticos.

Los medios químicos de ruptura son con solventes orgánicos (como la acetona o el butanol) y detergentes. Finalmente, existen medios enzimáticos, que hacen uso de lisozima, de papaína o de una combinación de ambas<sup>10,11</sup>.

La centrifugación es un paso casi de rutina para la separación de dos fracciones: la que contiene la enzima de la que no la contiene. La proteína, de hecho, se puede encontrar solubilizada en la fracción líquida o en forma precipitada, ya sea en forma asociada a otras fracciones subcelulares o libre de éstas.

### 1.2.8 Purificación.

Lo fundamental de la purificación consiste en una serie de fraccionamientos por los cuales se separa la enzima de otras proteínas: una vez que se tiene la enzima en solución, se somete a un fraccionamiento basado en algunas de sus propiedades características como la solubilidad, la carga, el tamaño y la actividad biológica, individualmente o en conjunto.

#### 1.2.8.1 PRECIPITACIÓN POR SOLVENTES ORGÁNICOS.

Las proteínas solubles en agua, contenidas dentro de un fluido celular, se pueden precipitar por solventes orgánicos miscibles con el agua, los más utilizados son etanol y acetona. La adición de estos solventes orgánicos a una solución acuosa de proteínas produce una disminución en el agua del poder solvatante de las moléculas de proteína hidrofílica con carga, lo que da una agregación-precipitación de la proteína<sup>19</sup>.

La precipitación por solventes orgánicos depende de varios factores como el tamaño de la proteína, la cantidad de solvente agregado y el pH de la solución proteica. Con la finalidad de evitar la desnaturalización de la proteína, es necesario agregar el solvente lentamente, con agitación continua y a temperaturas de alrededor de 0°C. Después de la precipitación, el solvente se remueve, eliminando las cantidades residuales por secado a vacío<sup>19</sup>.



### 1.2.8.2 "SALTING-OUT" DE PROTEÍNAS.

Esta técnica depende principalmente del carácter hidrofóbico de la proteína. El agua solvata los iones salinos agregados, disminuyendo el grado de solvatación de las proteínas presentes en solución y exponiendo sus partes hidrofóbicas a una interacción entre las mismas moléculas proteicas que provoca la formación de agregados que precipitan<sup>10,19</sup>.

El procedimiento involucra la disolución de la sal en la solución proteica o la adición de una solución saturada. La sal utilizada con mayor frecuencia es el sulfato de amonio, que tiene una gran solubilidad en agua: la concentración de saturación es 4 M ó 528 g/L, casi independientemente de la temperatura en un rango de -5 a 30°C. Una desventaja de esta técnica es que el precipitado contiene grandes cantidades relativas de sal que se deben remover posteriormente por diálisis o filtración por gel<sup>19</sup>.

### 1.2.8.3 DESNATURALIZACIÓN SELECTIVA.

Aunque las proteínas se consideran generalmente frágiles, las condiciones extremas se pueden utilizar a veces para una desnaturalización selectiva de enzimas indeseables que estén presentes en la disolución, sin afectar la proteína que se busca purificar. Los dos métodos más frecuentemente usados son con temperaturas o pH extremos<sup>10,19</sup>.

### 1.2.8.4 CROMATOGRAFÍA Y ELECTROFORESIS.

Las proteínas se pueden separar y purificar por una gran variedad de métodos cromatográficos: cromatografía de intercambio iónico en dietilaminoetilcelulosa (DEAE-celulosa) o carboximetilcelulosa, adsorción en hidroxapatita, filtración por gel en Sephadex o Bio-Gel de diferentes tamaños de poro y cromatografía de afinidad. Los componentes activos de las fracciones cromatográficas pueden concentrarse por liofilización, ultrafiltración o diálisis PEG<sup>10,19</sup>.

Además, se pueden utilizar las propiedades iónicas entre las proteínas para separarlas o purificarlas por electroforesis o convergencia isoelectrica. Tanto los métodos cromatográficos como los electroforéticos se usan como pasos terminales en una ruta de purificación<sup>19</sup>.

### 1.2.8.5 CRISTALIZACIÓN.

Muchas proteínas se han podido cristalizar como paso final del proceso de purificación. Para cristalizar, una proteína debe estar altamente purificada y con una concentración relativamente alta (10-20 mg/mL)<sup>19</sup>.

Aunque el procedimiento no es del todo sencillo, se ha desarrollado una técnica que facilita notablemente la cristalización. El método involucra una difusión de vapor en presencia de polietilenglicol: a bajas temperaturas, la muestra de proteína pierde agua a través de la difusión de vapor hasta alcanzar un equilibrio en el que los cristales se forman<sup>19</sup>.

### 1.2.8.6 CRITERIOS DE PUREZA.

El mejor criterio para asegurar que se tiene una enzima pura es cuando ésta se obtiene cristalizada; en otro caso no existe un ensayo que por sí solo garantice que se tiene una sola proteína. Sin embargo, pueden hacerse varias pruebas que, si resultan ser homogéneas, es válido aceptar que la enzima es pura.

La mayoría de las pruebas de homogeneidad empleadas están basadas en sus propiedades físicas y, en general, son comunes a todas las proteínas. Las más usuales son la ultracentrifugación analítica, la electroforesis y la técnica de electroenfoque<sup>10</sup>.

La ultracentrifugación analítica determina cuándo el material que se analiza sedimenta como un solo compuesto. La conducta de sedimentación depende del tamaño molecular y de la forma; sin embargo, las constantes de sedimentación de muchas proteínas son iguales o semejantes.

Los métodos electroforéticos son los más accesibles para distinguir claramente las mezclas de proteínas y se basan en las diferencias de carga de diferentes proteínas a un mismo pH, dando lugar a diferencias de migración en una corrida electroforética.

Lo que se usa frecuentemente es la electroforesis de zona, en la que se realiza una electroforesis sobre un gel con dos mitades idénticas, una de las cuales se tiñe con reveladores de proteína en general y la otra mitad se prueba con un revelador de la actividad enzimática que se está trabajando. La coincidencia de la actividad enzimática en la banda proteica con idéntica

posición prueba la presencia de la enzima en la banda; de existir otras bandas sin actividad, se tiene claramente la presencia de proteínas contaminantes. La existencia de más de una banda con actividad enzimática indica la presencia de isoenzimas, que son formas múltiples de una enzima, cada una con diferentes proporciones de las mismas cadenas polipeptídicas y con distintas velocidades catalíticas.

Finalmente, la técnica de electroenfoque, basada en la separación de proteínas por diferencias en pH, es uno de los métodos más sensibles y determinantes en cuanto a la pureza de la proteína. Sin embargo, siempre es preferible utilizar una técnica extra para concluir en cuanto a la pureza de la enzima.

### 1.2.9 Cuantificación de proteínas.

Se han desarrollado muchos métodos para la determinación de proteínas. Si la proteína a cuantificar es una enzima, existe un método extra a utilizar, el de la medición de la actividad enzimática.

Es importante tener presente que los análisis deben ser rápidos, reproducibles y sensibles, pues a medida que la proteína se aísla de su microambiente natural, aumenta su susceptibilidad a desnaturalizarse, perdiendo su característica dual de estructura-función.

#### 1.2.9.1 EL MÉTODO KJELDAHL.

Es uno de los primeros métodos surgidos para la cuantificación del nitrógeno proteico, se utiliza cuando se tienen cantidades relativamente grandes de muestra.

La muestra (1-10 g) se digiere con ácido sulfúrico muy concentrado (10 M) y calentando por varias horas. El nitrógeno de la proteína se convierte a sulfato de amonio y el ácido residual se neutraliza con sosa en exceso, que convierte el ion amonio a amoniaco. El amoniaco formado se destila en una

solución de ácido clorhídrico (0.1 M) que, finalmente, se valora con una solución estándar de hidróxido de sodio. El volumen gastado del estándar está directamente relacionado con la cantidad inicial de nitrógeno en la digestión<sup>19</sup>.

Puesto que la mayoría de las proteínas tiene alrededor del 16% de nitrógeno, la cantidad de nitrógeno encontrada se relaciona con un valor muy próximo al de la cantidad de proteína presente en la muestra.

### *1.2.9.2 ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA.*

Las proteínas tienen un cierto espectro de absorción en la región del ultravioleta. Por debajo de los 230 nm, la absorción de una proteína aumenta considerablemente, alcanzando un máximo alrededor de los 190 nm, debido a la absorbancia del enlace peptídico. Otras sustancias como los ácidos carboxílicos, los iones del buffer y los alcoholes, absorben también en esta región e interfieren con la medida, haciéndola poco específica para proteínas<sup>19</sup>.

Las proteínas también tienen características de absorción a 275-280 nm debido a la presencia de tirosina y triptófano. Cada tipo de proteína tiene un coeficiente de absorción molar específico que varía con la cantidad de tirosina y triptófano en la proteína. Las medidas de absorbancia a 280 nm se usan frecuentemente para seguir una corrida cromatográfica de separación de proteínas. El método es relativamente rápido, fácilmente automatizado, no destructivo y razonablemente sensible<sup>19</sup>.

Una desventaja de los métodos es que aún muchos otros compuestos absorben en la región de 280 nm, especialmente los ácidos nucleicos, que tienen un máximo de absorbancia a 260 nm. En este sentido, se ha desarrollado un método de corrección para la presencia de ácidos nucleicos, midiendo la razón entre las absorbancias a 280 y 260 nm, y utilizándola para estimar la proporción proteína-ácido nucleico en la muestra.

### 1.2.9.3 MÉTODO DEL BIURET.

Las proteínas y polipéptidos con dos o más enlaces peptídicos dan un color púrpura característico cuando se tratan con sulfato de cobre diluido a valores alcalinos de pH (reactivo del biuret). El color se debe a la formación de un complejo del ion cobre (II) con cuatro átomos de nitrógeno, provenientes de dos enlaces peptídicos. El amoniaco o los iones de amonio presentes interfieren en la determinación al formar el complejo tetraamincobre (II) de color azul intenso. La reacción del biuret requiere de cantidades relativamente grandes de proteína (1-20 mg)<sup>19</sup>.

### 1.2.9.4 MÉTODO DE FOLIN-LOWRY.

El método de Folin-Lowry es una modificación de la reacción del biuret para dar una determinación más sensible de proteína. Se utilizan dos reacciones coloreadas: la del biuret con cobre (II) alcalino y la reacción de una sal compleja de fosfomolibdotungstato, parte del reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu, que da un color azul verdoso con los complejos del biuret con tirosina y triptófano<sup>20</sup>.

Este método es diez veces más sensible que el de absorción ultravioleta y cien veces más que el del biuret. Sin embargo, el método puede ser sujeto a las interferencias de varias sustancias, como el ion potasio, Mg (II), ion amonio, EDTA, Tris, carbohidratos y algunos agentes reductores<sup>19</sup>.

### 1.2.9.5 MÉTODO DE BRADFORD.

El método utiliza un colorante, el azul brillante de Coomassie G-250, que tiene una carga negativa y se enlaza con las cargas positivas de la proteína. El colorante existe en sus formas roja y azul. La forma roja (absorbancia máxima a 465 nm) es la forma predominante en solución, pero cuando su parte negativa se enlaza a las partes de la proteína cargadas positivamente, se convierte a su forma azul (absorbancia máxima a 595 nm)<sup>21</sup>.

Debido a que muchas proteínas tienen una respuesta muy similar con este método, es posible utilizar unos cuantos estándares para un amplio espectro de proteínas. La reacción es altamente reproducible y rápida, el color es completo después de dos minutos de reacción y estable por cerca de una

hora. Existen muy pocas sustancias que interfieren en la cuantificación, como los detergentes dodecilsulfato de sodio y Triton X-100<sup>21</sup>.

Existe un método alternativo al de Bradford que utiliza el mismo colorante. La técnica<sup>22</sup> difiere sólo en la utilización del solvente para el azul de Coomassie y en la longitud de onda de trabajo.

### **1.3 Cinética química.**

#### **1.3.1 Cinética.**

Cuando se estudia una reacción química existen dos aspectos a considerar, uno estático y otro dinámico. El primero estudia la dirección y la extensión con que se produce la reacción; su estudio se hace con ayuda de la Termodinámica. El segundo aspecto, el dinámico, es el objetivo de la Cinética Química, que trata esencialmente de la velocidad con que se lleva a cabo la reacción y del camino que ésta sigue para llegar a los productos<sup>23</sup>.

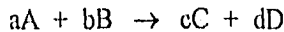
Existen dos razones fundamentales<sup>24</sup> para estudiar la velocidad de las reacciones. La primera es la importancia práctica de ser capaz de predecir la rapidez con que una mezcla reaccionante se moverá hacia su estado de equilibrio en las condiciones de trabajo. Su aplicación directa es en la síntesis química o microbiológica a nivel industrial, implicando el diseño y manejo de reactores; otra aplicación es en el estudio de las velocidades de descomposición de alimentos, fármacos y compuestos químicos en general.

La segunda razón para estudiar las velocidades de reacción (y que está muy relacionada con la primera) consiste en revelar los mecanismos de las

reacciones; por un lado, el determinar todos los pasos elementales de la reacción (cinética química clásica) y, por otro, el estudio de los pasos individuales en sí, implicando rotaciones, vibraciones y colisiones de moléculas individuales (dinámica química).

### 1.3.2 Velocidad de reacción.

La velocidad de una reacción se define como la variación con el tiempo de la concentración de una de las sustancias, reactivos o productos, que toman parte de la reacción. En una reacción del tipo



la velocidad de reacción  $r$  se puede expresar indistintamente (considerando los coeficientes estequiométricos), como velocidad de desaparición de uno de los reactivos o velocidad de formación de uno de los productos

$$r = -(1/a)(d[A]/dt) = -(1/b)(d[B]/dt) = (1/c)(d[C]/dt) = (1/d)(d[D]/dt)$$

El signo negativo indica que las concentraciones de A y B disminuyen con el tiempo. Debido a que las sustancias reaccionantes se van consumiendo continuamente durante una reacción química, la velocidad del proceso disminuirá al avanzar la reacción<sup>23</sup>.

### 1.3.3 Orden de reacción.

En general, la velocidad de reacción puede ser función de la concentración de todas las sustancias que forman parte de la misma<sup>23</sup>

$$r = f([A], [B], [C], [D])$$

y la ecuación que liga la velocidad con las concentraciones se llama ley de velocidad. No es posible predecir la ecuación de la ley de velocidad a partir de la ecuación estequiométrica, sino que se debe determinar experimentalmente. En la mayoría de los casos, la ecuación de velocidad se puede expresar como el producto de una constante de velocidad  $k$  por las concentraciones elevadas a una cierta potencia

$$r = k [A]^{\alpha} [B]^{\beta} [C]^{\gamma} [D]^{\delta}$$

Establecer la ley de velocidad cumple tres propósitos<sup>24</sup>. El primero es permitir la predicción de la velocidad, dadas la composición de la mezcla y el valor experimental del coeficiente de velocidad. El segundo es que la explicación de la ley de velocidad involucra el establecer un mecanismo para la reacción (un mecanismo aceptable debe estar de acuerdo con la ley de velocidad observada). El tercero es clasificar las reacciones en diferentes "órdenes".

El orden de una reacción con respecto a un componente es la potencia a la cual se eleva la concentración de dicho componente en la ley de velocidad. El orden global de reacción es la suma de las potencias de todas las concentraciones en la ley de velocidad. Los exponentes generalmente son números enteros sencillos, aunque también pueden ser fraccionarios o negativos, dependiendo de la complejidad de la reacción<sup>24</sup>.

El orden de una reacción no dice nada sobre la molecularidad de la misma. La molecularidad de una reacción indica el número de moléculas o especies que intervienen en un choque para dar lugar a una reacción elemental. La molecularidad es un concepto teórico, mientras que el orden de reacción es empírico; ambos valores numéricos pueden ser diferentes para una misma reacción<sup>23</sup>.

Las expresiones de velocidad que se vuelven muy complicadas, con frecuencia pueden simplificarse mediante el método de aislamiento de Ostwald, según el cual, cuando un reactivo está en gran exceso, su concentración no cambia casi nada en el transcurso de una reacción. Si la ley de velocidad es

$$r = k [A]^2 [B]$$



y A está en exceso,  $[A]$  es virtualmente constante,  $[A]^2 \approx [A]_0^2$  y puede incorporarse a la constante de velocidad para dar un nuevo coeficiente  $k' = k [A]_0^2$ . La ley de velocidad se simplifica entonces a

$$r \approx k' [B]$$

y se dice que la reacción tiene una ley de velocidad de pseudoprimer orden<sup>24</sup>. Lo mismo sucede si uno de los reactivos se regenera (es decir, que funciona como catalizador) de modo que su concentración es esencialmente constante.

### 1.3.4 Factores que afectan la velocidad de reacción.

La velocidad de una reacción química depende de múltiples factores, entre los que destacan principalmente la temperatura, la presión, el disolvente, la concentración salina y la presencia de catalizadores o inhibidores<sup>25</sup>.

Es bien conocido que el aumento de la temperatura eleva casi invariablemente la velocidad de una reacción química; sin embargo, existen casos en que el aumento de la temperatura ocasiona sólo un ligero aumento en la constante de velocidad de la reacción o, incluso, un descenso en la misma.

Por otro lado, en reacciones gaseosas es evidente que la presión del sistema puede jugar un papel muy importante en la velocidad de reacción; a mayores presiones generalmente se obtendrá un aumento en la velocidad de reacción.

La velocidad de reacción también puede depender fuertemente del disolvente utilizado debido a diversas causas. Los reactivos están generalmente solvatados y el grado de solvatación cambia según el disolvente, influyendo en el valor de la constante de velocidad. Algunos disolventes pueden catalizar la reacción. La mayoría de las reacciones en disolución implican iones o moléculas polares, donde las fuerzas electrostáticas entre los reactivos dependen de la constante dieléctrica del

disolvente. La velocidad a la que dos moléculas de reactivo pueden difundirse a través del disolvente para encontrarse entre sí, hacen que la constante de velocidad dependa de la viscosidad del disolvente. El valor de la constante de velocidad también puede afectarse por los enlaces de hidrógeno entre el disolvente y un reactivo.

En las reacciones iónicas en disolución, los coeficientes de actividad son importantes en la consideración de datos cinéticos. La constante de velocidad depende de la fuerza iónica de la disolución.

### 1.3.5 La influencia de la temperatura en la velocidad de reacción.

Las constantes de velocidad de reacción dependen sustancialmente de la temperatura. Una regla aproximada válida para muchas reacciones en disolución es que, cerca de la temperatura ambiente, la constante de velocidad de una reacción se duplica o triplica por cada aumento de temperatura de  $10^{\circ}\text{C}^{25}$ .

Arrhenius demostró que los datos de la constante de velocidad ( $k$ ) para algunas reacciones podían ajustarse a la expresión

$$k = Ae^{-E_a/RT}$$

donde  $A$  y  $E_a$  son constantes características de la reacción. Tomando logaritmo natural de dicha expresión, se tiene

$$\ln k = \ln A - E_a/RT.$$

Si la ecuación de Arrhenius se cumple, una representación de  $\ln k$  en función de  $1/T$  ha de dar una línea recta de pendiente  $-E_a/R$  y ordenada al origen  $\ln A^{25}$ .

En la ecuación de Arrhenius,  $E_a$  es la llamada energía de activación de Arrhenius, cuyas unidades están dadas generalmente en kcal/mol o kJ/mol. Nótese que una energía de activación pequeña significa que la reacción es

rápida y que una energía de activación alta significa reacción lenta. La energía de activación depende de la temperatura, pero los cambios son generalmente demasiado pequeños para ser detectadas a partir de los datos cinéticos disponibles experimentalmente, a menos que se haya estudiado un amplio rango de temperatura<sup>25</sup>.

La definición general de energía de activación para cualquier proceso cinético, tanto si es o no es función de la temperatura, se presenta como

$$E_a = RT^2 \frac{d(\ln k)}{dT}$$

Si  $E_a$  es independiente de la temperatura, la integración da la ecuación de Arrhenius. Las energías de activación empíricas caen en el rango de 0 a 80 kcal/mol para la mayoría de las reacciones químicas elementales y tienden a ser más bajas para las reacciones bimoleculares que para las unimoleculares. Un límite superior sobre los valores de  $E_a$  viene establecido por el hecho de que reacciones con energías de activación muy grandes son demasiado lentas para ser observadas<sup>23</sup>.

### 1.3.6 Catalizadores.

Un catalizador aumenta la velocidad de reacción y es recobrado, sin cambio químico, al final de dicha reacción. Los inhibidores o catalizadores negativos disminuyen la velocidad de una reacción, aún cuando se añaden en pequeñas cantidades, destruyendo un catalizador ya presente en el sistema<sup>25</sup>.

Cuando la energía de activación de una reacción es elevada a temperaturas normales, solamente una pequeña proporción de encuentros moleculares tiene energía suficiente para producir reacción. Un catalizador disminuye la energía de activación de la reacción (normalmente proporcionando un camino alternativo que evita la etapa lenta determinante de la reacción no catalizada) y da como resultado una velocidad de reacción más elevada a la misma temperatura. Los catalizadores pueden ser muy efectivos: las enzimas, catalizadores biológicos, son muy específicas y, en general, tienen un efecto drástico en la velocidad de la reacción que controlan<sup>25</sup>.

Hay dos clases de catalizadores. El catalizador homogéneo está en la misma fase que la mezcla de reacción. El catalizador heterogéneo está en una fase distinta. Dos tipos importantes de catálisis homogénea son la catálisis ácida y la catálisis básica. Muchas reacciones orgánicas implican una u otra (y a veces las dos). La catálisis ácida es la transferencia de un ion hidrógeno al sustrato. La catálisis básica implica la transferencia de un ion hidrógeno del sustrato a la base<sup>25</sup>.

La catálisis heterogénea depende normalmente de que se adsorba al menos un reactivo (normalmente quimiadsorbido) y se modifique de modo que reaccione más fácilmente. En las reacciones catalizadas por sólidos por lo general se considera un mecanismo de cinco etapas: difusión de los reactivos hasta la superficie del sólido (1) y una posterior quimisorción (2), la reacción de las moléculas adsorbidas en la superficie (3), una desorción de los productos de la superficie (4) y su difusión hacia la fase fluida (5)<sup>25</sup>.

## **1.4 Cinética enzimática.**

### **1.4.1 Actividad enzimática.**

El potencial catalizador de las enzimas se ha estandarizado definiendo para cada enzima lo que se conoce como unidad de actividad enzimática. Una Unidad Internacional equivale a la cantidad de enzima capaz de catalizar la transformación de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto a 25°C en condiciones óptimas de medición<sup>11</sup>.

Esta definición no siempre es aplicable porque en algunos casos no puede medirse analíticamente la aparición del producto o la desaparición del sustrato. Esta es la razón por la cual se reportan en la literatura diferentes

definiciones de unidades de actividad enzimática adaptadas a casos específicos.

Las unidades se dan generalmente en unidades/ml de solución enzimática o en unidades/mg de enzima, dependiendo del estado físico en que se encuentre la enzima. La llamada actividad específica se expresa en unidades/mg de proteína y es un parámetro indispensable en la evaluación de la pureza o de un proceso de purificación de las enzimas. La actividad molecular se expresa en unidades/ $\mu\text{mol}$  de enzima a concentración óptima de sustrato<sup>11</sup>.

Una unidad internacional recomendada para la actividad de la enzima es el katal (se abrevia kat), definida como la cantidad de enzima que transforma 1  $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$  de sustrato. De esta forma, la actividad específica se expresa en katal/kilogramo de proteína y la actividad molar en katal/mol de enzima<sup>11</sup>.

#### 1.4.2 Modelo de Michaelis-Menten.

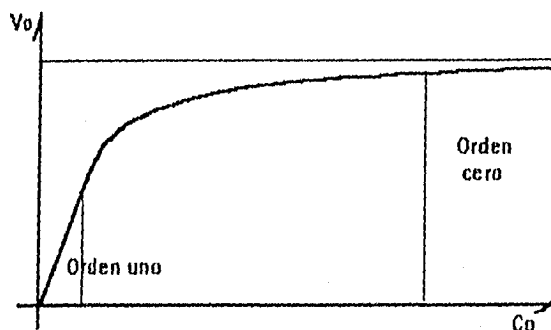
En cinética enzimática es costumbre trabajar con velocidades iniciales de reacción ( $V_0$ ) debido a tres razones fundamentales: se minimiza el efecto de la reacción inversa, el producto puede inhibir la enzima y, finalmente, durante la reacción se pueden alcanzar cambios drásticos de temperatura o pH que desnaturalizan la enzima<sup>26</sup>.

Las enzimas pueden considerarse como catalizadores biológicos que siguen las reglas generales de la catálisis. Sin embargo, presentan una característica especial no observada en los catalizadores comunes, un fenómeno llamado saturación del sustrato<sup>11</sup>.

En la gráfica I se esquematiza el comportamiento característico de las enzimas con respecto a la concentración inicial de sustrato ( $C_0$ ). Matemáticamente, la curva resultante (una hipérbola rectangular) tiene una ecuación del tipo

$$V_0 = a C_0 / (b + C_0)$$

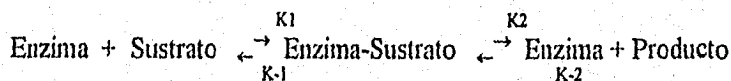
donde a y b son dos valores constantes<sup>26</sup>.



Gráfica I. Variación de la velocidad inicial de una reacción enzimática como función de la concentración inicial de sustrato.

Cinéticamente, a concentraciones bajas de sustrato se observa una variación lineal con la velocidad inicial de la reacción, es decir, la reacción es de primer orden. A medida que la concentración del sustrato aumenta, la velocidad inicial crece en forma cada vez menos lineal, hasta alcanzar un valor constante para cualquier valor de concentración del sustrato (saturación de la enzima), lo que implica que se tiene una reacción de orden cero. En la zona de transición se tienen órdenes de reacción fraccionarios entre uno y cero<sup>11</sup>.

Considerando tal fenómeno de saturación, en 1903, Henri, y en 1913, Michaelis y Menten, propusieron el modelo de catálisis enzimática más simple y mejor conocido hasta ahora, el modelo de Michaelis-Menten<sup>27</sup>. Esta teoría supone la formación de un complejo enzima-sustrato que posteriormente da lugar al producto de la reacción, regenerando así la enzima:



Siguiendo tal mecanismo y considerando que la reacción que da origen al producto es prácticamente irreversible ( $k_2 \gg k_{-2}$ ), la velocidad inicial de formación de producto está dada por

$$V_0 = k_2 [ES]$$

donde  $[ES]$  es la concentración del complejo enzima-sustrato. Michaelis y Menten asumieron que  $k_{-1} \gg k_2$ , de tal forma que el primer paso de la reacción (la formación del complejo enzima-sustrato) llega rápidamente a un proceso de equilibrio<sup>26</sup>.

Poco después del inicio de la reacción se tiene que

$$[E] = [E]_0 - [ES]$$

$$[S] = [S]_0 - [ES]$$

donde  $[E]$  y  $[S]$  son, respectivamente, las concentraciones de enzima y sustrato, y el subíndice 0 se refiere a las concentraciones iniciales. Experimentalmente se sabe que, en general,  $[S]_0$  es mucho más grande que  $[E]_0$ , por lo que  $[S] \approx [S]_0$ .

Si se define la constante de disociación  $K_S$  como

$$K_S = k_{-1} / k_1 = [E][S] / [ES]$$

como  $[E] = [E]_0 - [ES]$  y  $[S] \approx [S]_0$ , se tiene que

$$K_S = ([E]_0 - [ES]) [S]_0 / [ES]$$

Despejando  $[ES]$ ,

$$K_S = ([E]_0 [S]_0 / [ES]) - [S]_0$$

$$K_S + [S]_0 = [E]_0 [S]_0 / [ES]$$

$$[ES] = [E]_0 [S]_0 / (K_S + [S]_0)$$

y sustituyendo en la ecuación de  $V_0$ , se tiene

$$V_0 = k_2 [ES] = k_2 [E]_0 [S]_0 / (K_S + [S]_0)$$

que corresponde a la ecuación de la hipérbola.

Existe una velocidad inicial máxima que se obtiene cuando toda la enzima presente esta complejada con el sustrato a altas concentraciones de éste ( $[S]_0 \gg K_S$ , es decir,  $K_S + [S]_0 \approx [S]_0$ ), por lo que se tiene

$$(V_0)_{\text{máx}} = k_2 [E]_0 .$$

Briggs y Haldane<sup>27</sup> desarrollaron en 1925 un modelo matemático en el que era innecesario asumir que la enzima y el sustrato están en equilibrio termodinámico con el complejo enzima-sustrato. Postularon que un poco después de que la enzima y el sustrato se mezclan, la concentración del complejo alcanza un valor constante tal que es posible aplicar una aproximación llamada del estado estacionario<sup>26</sup>,

$$d [ES] / d t = 0 .$$

Por otro lado, de la definición de velocidad, se tiene que

$$d [ES] / d t = k_1 [E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES]$$

por lo que

$$k_1 [E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0$$

$$k_1 [E][S] = (k_{-1} + k_2) [ES]$$

Otra vez, como  $[E] = [E]_0 - [ES]$  y  $[S] \approx [S]_0$ , se tiene que

$$k_1 ([E]_0 - [ES]) [S]_0 = (k_{-1} + k_2) [ES]$$

$$([E]_0 - [ES]) [S]_0 / [ES] = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

En este momento puede definirse  $K_m$



$$K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

que es la llamada constante de Michaelis, para tener

$$([E]_0 - [ES]) [S]_0 / [ES] = K_m$$

despejando [ES]

$$[ES] = [E]_0 [S]_0 / (K_m + [S]_0)$$

y sustituyendo en la ecuación de  $V_0$ , se tiene

$$V_0 = k_2 [E]_0 [S]_0 / (K_m + [S]_0)$$

Sustituyendo  $(V_0)_{\text{máx}} = k_2 [E]_0$ , se obtiene la ecuación de Michaelis-Menten,

$$V_0 = (V_0)_{\text{máx}} [S]_0 / (K_m + [S]_0)$$

donde la constante de Michaelis equivale a la concentración de sustrato para la cual la velocidad inicial es la mitad de la máxima, dando también una idea de la afinidad que tiene la enzima por el sustrato en cuestión, pues cuanto menor sea su valor, menor será la concentración del sustrato para la cual la enzima alcanza su valor máximo.

### 1.4.3 Incompatibilidad de la teoría de Michaelis-Menten.

No todas las enzimas expresan un comportamiento como el descrito por la ecuación de Michaelis. La desviación más común se debe a la inhibición por exceso de sustrato<sup>10</sup>. Aunque existen varias explicaciones para este tipo de comportamiento, una de las más aceptadas es que la enzima se puede unir al sustrato por varios enlaces, ocasionando que, a concentraciones altas de sustrato, varias moléculas de éste se pueden unir a un mismo sitio, inactivándolo<sup>10</sup>.

Otro caso de desviación es el de activación por el sustrato, que supone la coexistencia equilibrada de dos formas de la enzima, una de las cuales presenta menor actividad<sup>10</sup>. Una molécula de sustrato que se enlaza con un primer sitio de la enzima, cambia la conformación de otro sitio de enlace, alterando su afinidad por una segunda molécula de sustrato<sup>19</sup>.

#### 1.4.4 Tratamientos de la ecuación de Michaelis.

Aunque la información cinética ( $K_m$  y  $(V_0)_{\text{máx}}$ ) se puede obtener directamente de una gráfica de  $V_0$  contra  $[S]_0$ , es bastante más exacto utilizar alguna de las modificaciones algebraicas de la ecuación de Michaelis.

El método más común es el de Lineweaver-Burk<sup>28</sup>, en el que se toma el recíproco de la ecuación de Michaelis-Menten para obtener una ecuación de la forma de la línea recta. De tal modo, reorganizando términos, se tiene

$$1/V_0 = (K_m/(V_0)_{\text{máx}})(1/[S]_0) + (1/(V_0)_{\text{máx}}).$$

Una gráfica de  $1/V_0$  contra  $1/[S]_0$  da una línea recta con pendiente  $K_m/(V_0)_{\text{máx}}$  y ordenada al origen  $1/(V_0)_{\text{máx}}$ .

Si es cierto que el método es muy usual, tiene la desventaja de comprimir los puntos de los datos a altas concentraciones en una región muy pequeña, mientras que enfatiza los puntos para bajas concentraciones de sustrato.

Otro método empleado es el de Eadie-Hofstee<sup>19</sup>. En este caso, la ecuación de Michaelis-Menten se divide en ambos lados de la ecuación por la concentración del sustrato. Rearreglando términos, se encuentra que

$$V_0 = -K_m (V_0/[S]_0) + (V_0)_{\text{máx}}$$

Construyendo entonces una gráfica  $V_0$  contra  $V_0/[S]$ , se encuentra una línea recta con pendiente  $-K_m$  y ordenada al origen  $(V_0)_{\text{máx}}$ .

En este caso se tiene una distribución mejor en cuanto a los puntos obtenidos, así como una obtención directa de los parámetros  $K_m$  y  $(V_0)_{m\acute{a}x}$ .

#### 1.4.5 Efecto de la temperatura.

Como toda reacción química, las reacciones enzimáticas se modifican con la temperatura. En general se observa un fenómeno común de aumento en la velocidad de reacción cuando aumenta la temperatura, ésto se debe a una mayor energía en las moléculas reaccionantes. El efecto cinético de la temperatura se puede describir generalmente por la ecuación de Arrhenius<sup>10</sup>.

Sin embargo, existe un efecto adicional en las reacciones enzimáticas. A cierta temperatura se sobrepone una desnaturalización de la enzima característica de las proteínas. El resultado global es, primero, un aumento de la velocidad con respecto de la temperatura y, después, una disminución de velocidad de reacción a medida que aumenta la temperatura. Se obtiene entonces un valor máximo de velocidad a una cierta temperatura que se denomina temperatura óptima<sup>11</sup>.

#### 1.4.6 Efecto del pH.

El comportamiento que siguen las reacciones enzimáticas a diferentes valores de pH depende principalmente de tres fenómenos independientes<sup>10</sup>:

- (a) a valores de pH extremos, las enzimas pueden desnaturalizarse irreversiblemente, debido a la pérdida de su estructura espacial por ruptura de enlaces no covalentes;
- (b) las enzimas suelen tener diferentes estados de ionización que dependen del valor de pH en que se encuentren;
- (c) si el sustrato posee grupos polares, éste puede ionizarse también, de acuerdo con el valor de pH de la solución de reacción.

El efecto conjunto de tales factores determina un máximo de velocidad a un valor de pH específico. Este valor no necesariamente coincide con el valor de pH de máxima estabilidad de la enzima.

Es necesario recalcar que la actividad de una enzima depende de la naturaleza misma del buffer utilizado y de su concentración en solución<sup>27</sup>.

#### 1.4.7 Activación e inhibición.

Muchos compuestos químicos pueden activar o inhibir la actividad catalítica de las enzimas. Algunos iones inorgánicos pueden estar directamente involucrados en la reacción enzimática por complejamiento con alguna coenzima o cosustrato. En otros casos, el ion es parte de la enzima y puede actuar como un estabilizador de su conformación activa o participar directamente en el sitio activo de la enzima<sup>27</sup>.

Algunas sustancias diferentes del sustrato pueden interactuar con las enzimas, disminuyendo su actividad. El estudio de la inhibición enzimática se ha desarrollado bastante y se reconocen dos diferentes tipos de inhibición: reversible e irreversible.

En las inhibiciones reversibles existe un equilibrio entre la enzima y el inhibidor; se reconocen tres tipos distintos: inhibiciones competitiva, no competitiva y acompetitiva<sup>19</sup>.

En la inhibición competitiva, el inhibidor compite con el sustrato por enlazarse con el sitio activo de la enzima. El complejo enzima-inhibidor es incapaz de catalizar la formación de producto y su formación es mucho más rápida que la del complejo enzima-sustrato<sup>27</sup>. El efecto total es que permanece constante la velocidad inicial máxima, pero se obtienen diferentes constantes de Michaelis aparentes<sup>19</sup>.

En la inhibición no competitiva, el inhibidor no afecta el enlace del sustrato con el sitio activo de la enzima. Sin embargo, se forma un complejo enzima-sustrato-inhibidor que no reacciona para formar el producto<sup>28</sup>. Puede ocurrir una mezcla de inhibiciones en la que el complejo enzima-sustrato se enlaza con el inhibidor, pero también se puede formar el complejo enzima-inhibidor que se enlaza con el sustrato; el producto es siempre el complejo enzima-sustrato-inhibidor que es incapaz de formar el producto de reacción. En este caso, la constante de Michaelis no cambia pero la velocidad inicial máxima si se afecta<sup>19</sup>.

En la inhibición acompetitiva, el inhibidor puede enlazarse al complejo enzima-sustrato pero no a la enzima sola<sup>29</sup>. Aunque cambian tanto la constante de Michaelis aparente como la velocidad inicial máxima, la relación  $K_m / (V_0)_{\text{máx}}$  permanece constante.

Finalmente, en la inhibición irreversible, el inhibidor forma un enlace covalente con un residuo activo en el sitio activo de la enzima. Este enlace es tan estable que no se puede hablar de equilibrios y la inhibición aumenta progresivamente con el paso del tiempo; incluso se puede alcanzar una inhibición completa si la concentración del inhibidor excede la de la enzima<sup>26,29</sup>.

## II. Antecedentes

### 2.1 Polifenoloxidasas.

#### 2.1.1 Generalidades.

La polifenoloxidasa (o-difenol:oxígeno reductasa, 1.10.3.1 en la Clasificación Enzimática) se ha nombrado también como tirosinasa, polifenolasa, fenolasa, catecol oxidasa, cresolasa y catecolasa<sup>30</sup>. Esta polifenoloxidasa es un complejo proteína-cobre<sup>31</sup> en una relación 1:2.

La enzima comenzó a llamarse tirosinasa porque la tirosina fue el primer sustrato usado en su estudio. Sin embargo, es preferible reservar el nombre de tirosinasa para las enzimas que se encuentran en mamíferos, las cuales tienen una especificidad limitada a la tirosina y la dihidroxifenilalanina. Las enzimas que provienen de plantas superiores y del reino fungi oxidan, por el contrario, una gran variedad de compuestos fenólicos<sup>30</sup>.

El efecto de la enzima fue reportado por primera vez en 1856 por Schoenbein, quien describió una enzima en hongos que, en presencia de oxígeno molecular, ocasionaba la oxidación de ciertos compuestos de las plantas. La enzima está probablemente presente en todas las plantas, pero tiene una alta concentración en hongos, papas, manzanas, plátanos, aguacates, hojas de té, granos de café y hojas de tabaco<sup>30</sup>.

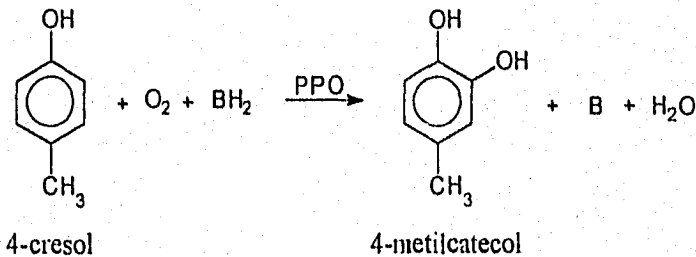
Por un lado, las polifenoloxidasas tienen un papel útil en el tratamiento de té, café y tabaco<sup>32</sup>. Sin embargo, estas enzimas se conocen mejor por su carácter perjudicial, pues causan el oscurecimiento (pardeamiento) de tejidos vegetales rotos o maltratados, por lo que son determinantes en la calidad de muchas frutas y verduras<sup>30</sup>.

A diferencia de otras enzimas, la polifenoloxidasasa puede catalizar dos tipos muy diferentes de reacción, ambos involucran compuestos fenólicos. Estas reacciones son la hidroxilación de monofenoles para dar o-difenoles (actividad de cresolasa) y la oxidación de o-difenoles para dar o-quinonas (actividad de catecolasa). Ambos tipos de reacción, sin embargo, difieren en su actividad total, dependiendo del método de preparación<sup>30</sup>.

Aunque, en un principio, la doble actividad de la enzima fue un problema particularmente complejo, ahora se sabe que ésto se debe a que la enzima existe en varias formas moleculares múltiples (isoenzimas) que no tienen la misma actividad relativa sobre los distintos sustratos ni tienen las mismas cantidades de cobre (metal presente en la enzima)<sup>33,34</sup>.

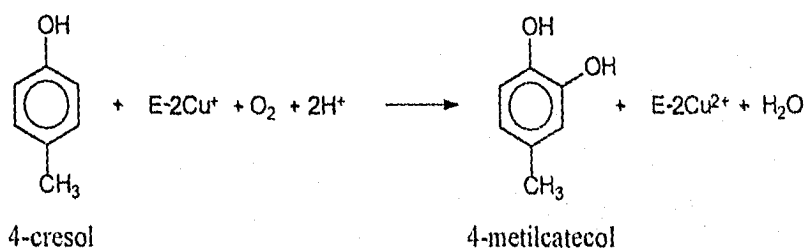
### 2.1.2 Reacciones de hidroxilación.

La polifenoloxidasasa (PPO) hidroxila monofenoles y frecuentemente se dice que se trata de su actividad de cresolasa, debido a que el sustrato más comúnmente usado para su estudio es el p-cresol<sup>30</sup>.



Se ha comprobado que el oxígeno de la hidroxilación viene directamente de oxígeno molecular y no de las moléculas de agua que pudieran estar presentes. Un átomo del oxígeno molecular se incorpora en el fenol, el otro átomo se incorpora a la molécula de agua formada. Se dice entonces que la enzima actúa como monooxigenasa en esta reacción<sup>31</sup>.

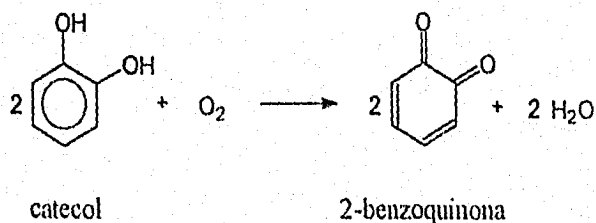
Las polifenoloxidasas de algunos productos vegetales no tienen la habilidad de hidroxilar monofenoles. Ésto se debe a que se requiere de una pequeña cantidad de catecol para dar inicio a la reacción. Algunas enzimas, en ausencia del o-difenol, pueden producir pequeñas cantidades de éste, de acuerdo con la reacción siguiente.



La función del difenol es reducir la enzima de la forma E-2Cu<sup>2+</sup> a E-2Cu<sup>+</sup> que sólo hasta entonces puede hidroxilar el monofenol<sup>30</sup>.

### 2.1.3 Oxidación de o-difenoles.

El segundo tipo de reacciones catalizadas por la polifenoloxidasas es la oxidación de un o-difenol a una benzoquinona. Se dice entonces que la enzima tiene actividad de catecolasa, siendo el catecol el difenol más simple que oxida la polifenoloxidasas<sup>30</sup>.





Todas las polifenoloxidasas tienen actividad sobre o-difenoles. El mecanismo de oxidación no se conoce con certeza. El mecanismo propuesto que se muestra en la figura 1 es consistente con los datos experimentales, incluyendo la evidencia de que no se forman radicales libres en la reacción<sup>35</sup>. Algunas investigaciones del orden en que se enlazan el oxígeno molecular y el o-difenol a la enzima, indican que el oxígeno se debe de enlazar primero<sup>36</sup>.

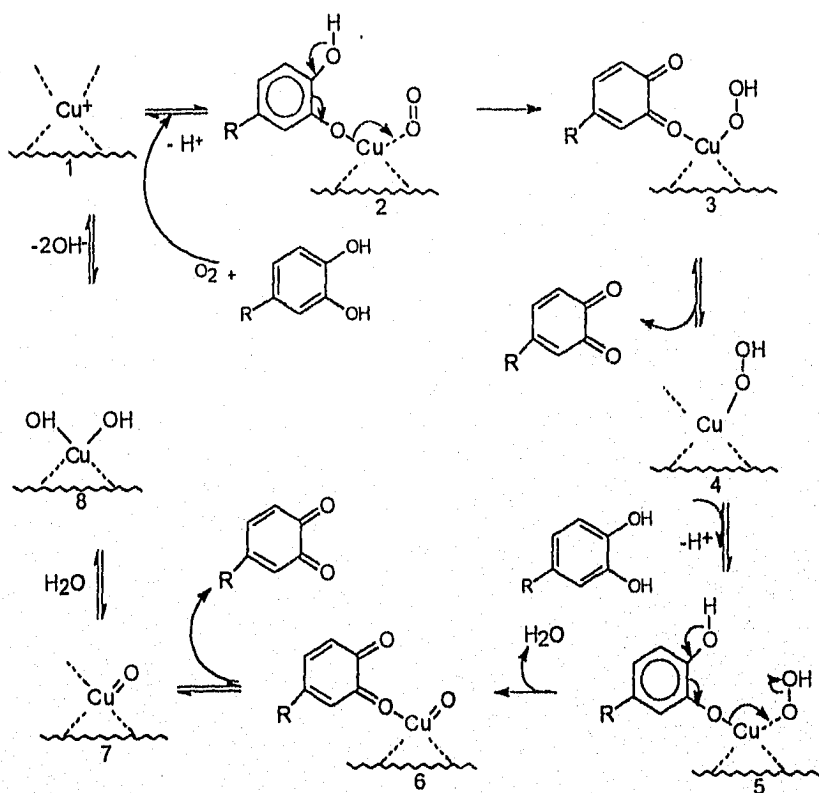


Figura 1. Mecanismo propuesto para la reacción de oxidación de o-difenoles por acción de la enzima polifenoloxidasas.

Las benzoquinonas formadas sufren posteriormente una polimerización, redituando un producto mucho más oscuro que el mismo monómero. Además, aunque muchos de los compuestos fenólicos y aminoras de las plantas no sirven como substrato de la polifenoloxidasas, éstos pueden reaccionar rápidamente con la o-benzoquinona producida (adición en posición 4- ó 5-) para dar compuestos cuyos coeficientes de absorbancia molar son mucho más grandes que aquellos que se forman por la polimerización de la o-benzoquinona sola. Por esta razón, los productos de la actividad de la polifenoloxidasas en frutas son tan complejos y, generalmente, de colores oscuros<sup>30</sup>.

#### **2.1.4 Modificación de la actividad de la polifenoloxidasas.**

El oscurecimiento de las frutas causado por la polifenoloxidasas puede prevenirse por exclusión de oxígeno molecular (limitación de substrato), por adición de agentes reductores que previenen la acumulación y polimerización de la o-benzoquinona formada, por medio de agentes complejantes (tales como el fluoruro y azida de sodio) que inactivan la enzima al reaccionar con el cobre de la enzima o por tratamiento térmico (destrucción térmica de la enzima)<sup>30</sup>.

Un método favorito para prevenir el oscurecimiento enzimático es la adición de un agente reductor, el ácido L-ascórbico, que reduce de vuelta la o-benzoquinona formada a la misma velocidad con que se produce. De esta manera, no habrá oscurecimiento mientras esté presente el ácido ascórbico<sup>30</sup>.

## 2.2 Cinética de reacción de las polifenoloxidasas.

### 2.2.1 Medidas de la actividad de catecolasa.

La actividad de catecolasa de las polifenoloxidasas se puede seguir independientemente de su actividad de cresolasa, utilizando o-difenoles como sustratos. Sin embargo, las mediciones de ésta actividad se puede complicar por una inactivación rápida de la enzima, por la polimerización de la o-benzoquinona formada o por la inhibición de la enzima a altas concentraciones de sustratos<sup>30</sup>.

La oxidación del sustrato generalmente se detiene mucho antes de que éste se convierta totalmente a producto, dependiendo de la concentración inicial de la enzima. Debido a esta inactivación de la enzima, la velocidad inicial generalmente es lineal por sólo un pequeño intervalo de tiempo (menos de dos minutos). La polifenoloxidasa se inactiva debido a que el producto de reacción, la benzoquinona, se adhiere a la enzima formando un enlace covalente en o cerca del sitio activo<sup>30</sup>.

Después de la reacción ocurren otras reacciones (no necesariamente enzimáticas) que forman productos insolubles de colores parduscos. Estas reacciones consumen además oxígeno molecular. La formación de o-benzoquinona a partir de catecol consume una cantidad equimolar de oxígeno; sin embargo, el proceso total, incluyendo la formación del pigmento, consume más de dos veces esta cantidad de oxígeno. De esta manera, es necesario trabajar sólo con velocidades iniciales, con el fin de no cuantificar las reacciones posteriores a la oxidación del difenol<sup>37</sup>.

### 2.2.2 Métodos para la determinación de actividades.

La actividad enzimática de la polifenoloxidasas, como catecolasa, se ha estudiado por diversos métodos: manométrico, polarográfico, cronométrico y espectrofotométrico, entre otros<sup>30</sup>.

Los métodos manométrico y polarográfico miden la cantidad de oxígeno consumido durante la reacción, utilizando, respectivamente, un manómetro y un electrodo, sensibles a oxígeno molecular. El método cronométrico determina los tiempos en los cuales se observa un cierto color en la reacción cuando ésta se lleva a cabo en presencia de cantidades específicas de ácido ascórbico. Finalmente, el método espectrofotométrico mide la absorbancia creciente de la benzoquinona formada con respecto del tiempo<sup>37</sup>.

Al utilizar los diferentes métodos, se pueden obtener resultados muy diferentes entre sí. El método manométrico da los resultados menos sensibles y se requieren mayores cantidades de enzima para su realización. Los métodos cronométrico y espectrofotométrico dan resultados similares aunque no se obtiene una respuesta lineal para el primero. El método polarográfico da los resultados con la mayor sensibilidad y una muy buena relación lineal<sup>37</sup>.

El método polarográfico es el más recomendado por su rapidez, sensibilidad y reproducibilidad. Los métodos espectrofotométricos, sin embargo, son más viables en un laboratorio común y, de hecho, son los más ampliamente reportados en la literatura.

### 2.2.3 Actividad en la naturaleza.

La reacción de oscurecimiento en frutas y vegetales, resultado de daños mecánicos durante su almacenamiento, procesamiento o comercialización, es un fenómeno característico y muy indeseable por su efecto en la apariencia desagradable y en la modificación del sabor de los diversos productos. El oscurecimiento es causado principalmente por la oxidación de

polifenoles presentes en el tejido y la subsecuente polimerización de las quinonas, tanto por reacciones enzimáticas como no enzimáticas. La enzima que inicia esta serie de reacciones es la polifenoloxidasas<sup>38</sup>.

Algunos reportes discuten el papel de los polifenoles y la polifenoloxidasas en la reacción de oscurecimiento. En varios productos alimenticios, el grado de oscurecimiento puede relacionarse directamente al nivel de polifenoloxidasas, al contenido de polifenoles en el tejido o una combinación específica de los dos factores<sup>39</sup>.

Existen cientos de artículos (revisar el Food Science and Technology Abstracts) que describen los estudios de la actividad de las polifenoloxidasas en diversos productos de origen vegetal (hongos, uvas, manzanas, plátanos, aguacates, peras, mangos, naranjas, guayabas, fresas, ciruelas, duraznos, kiwis, papas, berenjenas, camotes, zanahorias, té, espinacas, col, albahaca, ajos, chiles, pepinos, alcachofas, chirimoyas, aceitunas, semillas de girasol, cacao, nuez, soya, habas, frijoles, cocoa, harinas, vinos, etc.) y unos pocos productos de origen animal (camarones y langostas).

La actividad de las polifenoloxidasas extraídas de muy diversas fuentes, se prueban utilizando diferentes sustratos. Los polifenoles más comúnmente utilizados son catecol, 4-metilcatecol, pirogalol, d-catequina, ácido gálico, ácido clorogénico, ácido caféico, dopa (3,4-dihidroxifenilalanina) y dopamina (3,4-dihidroxifenilamina). Puede obtenerse una especificidad relativa entre los diferentes sustratos para la misma enzima.

Además, tal actividad se puede probar a diferentes temperaturas, valores de pH o en presencia de diferentes posibles inhibidores de la oxidación.

## 2.3 Polifenoloxidasas en el aguacate.

### 2.3.1 Isoenzimas.

A pesar del bien conocido potencial de oscurecimiento tan alto de los aguacates, su estudio había quedado muy limitado hasta antes de 1970<sup>40</sup>. Existían sólo dos reportes que contienen investigaciones de las polifenoloxidasas en aguacate. Uno de ellos expresaba que, de varios sustratos estudiados, los oxidados más rápido por la enzima eran el ácido nordihidroguayarático, el catecol y la catequina; sin embargo, se pensaba que la enzima era una sola.

Posteriormente se encontró que las fracciones enzimáticas extraídas de aguacate contenían por lo menos seis isoenzimas. Cada fracción presentaba cierta especificidad característica hacia algún sustrato en especial<sup>40-42</sup>.

### 2.3.2 Extracción.

Las enzimas se han obtenido de diversas variedades de aguacate: Fuerte<sup>39,41-48</sup>, Lerman<sup>38,39,42,45,46,48</sup> y Horeshim<sup>38,42</sup>, principalmente. No se encontraron reportes de estudios de las polifenoloxidasas extraídas de la variedad Hass, una de la más comunes en nuestro país.

El método general para la extracción de la enzima a partir de aguacates es el siguiente. Se hacen repetidas lixiviaciones de la pulpa en acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Con esto, son disueltos principalmente los pigmentos y lípidos del fruto. La materia insoluble se filtra y se seca, recibiendo el nombre de "polvo cetónico"<sup>40</sup>

El polvo cetónico se agita durante algunas horas en buffer de fosfatos. La enzima polifenoloxidasa pasa a la fase acuosa, que se separa de los

insolubles por centrifugación. El líquido resultante es denominado "extracto crudo" y representa una disolución de la enzima impura<sup>40</sup>

### 2.3.3 Purificación.

Se han propuesto métodos consecutivos de purificación de la enzima. El primer paso es la precipitación de la enzima con sulfato de amonio al 40-70% de saturación a 0°C. La suspensión se centrifuga y la pastilla se separa y se disuelve en una nueva buffer de fosfatos. Posteriormente, la disolución resultante se dializa por varias horas<sup>40,42,46</sup>

En este momento se tiene una polifenoloxidasa parcialmente purificada y que se puede utilizar ya en las medidas de actividad enzimática. Se pueden llevar, sin embargo, posteriores purificaciones: sucesivas precipitaciones con sulfato de amonio y diálisis, o bien, cromatografías o electroforesis con diferentes productos (gel de poliacrilamida, Sephadex, celulosa, etc.).

En la tabla II se muestra la actividad específica (U/mg de proteína) de la enzima en diferentes pasos de su purificación<sup>40</sup>.

Tabla II. Efecto de la purificación de la enzima polifenoloxidasa en su actividad.

Etapas de purificación	Actividad específica
Extracción en buffer del polvo cetónico	26
Precipitación con sulfato de amonio	52
Diálisis	70-100
Primera cromatografía	200-350
Segunda cromatografía	725

### 2.3.4 Actividad enzimática.

La actividad enzimática de la polifenoloxidasas se ha estudiado por el método espectrofotométrico en todos los casos encontrados<sup>38-48</sup>, dando buenos resultados. Se han utilizado extractos enzimáticos crudos y parcialmente purificados. Se han probado sustratos individuales y extractos directos del aguacate con sus polifenoles naturales mezclados.

En aguacate se han encontrado fenoles como el 4-metilcatecol, ácido clorogénico, catequina, dopamina y ácido cefeico<sup>40</sup>.

Las cinéticas de reacción se han hecho a diferentes concentraciones de sustrato, distintas concentraciones de la enzima, diferentes valores de pH y varias temperaturas. Se muestran en la tabla III algunas de las constantes de Michaelis ( $K_m$ , mM) reportadas para varios sustratos en diferentes variedades de aguacate.

Tabla III. Parámetros cinéticos para la enzima polifenoloxidasas de aguacates.

Polifenol	Híbrido <sup>40</sup>	Lerman <sup>45</sup>	Fuerte <sup>45</sup>
catecol	6.8	2.4	7.7
4-metilcatecol	2.0	1.0	0.87
ácido clorogénico	7.0	3.0	3.0
catequina	1.8	-	-
pirogalol	5.0	1.6	2.13
dopa	27	3.6	6.0
dopamina	1.1	0.5	0.25
ácido caféico	-	-	1.6



### 2.3.5 Inhibición de la enzima.

Existen pocos reportes en los que se han probado inhibidores de las polifenoloxidasas del aguacate. El dietilditiocarbamato de sodio y la 1-fenil-2-tiourea fueron los dos primeros compuestos probados en aguacates, dando cierta actividad inhibitoria a bajas concentraciones. Posteriormente, se ha encontrado que también funcionan como inhibidores la tiourea, el ditiotreitól y la DL-cisteína<sup>45</sup>.

Se piensa que estos compuestos sulfhídricos inhiben las polifenoloxidasas debido a que remueven quinonas, previniendo su participación en las reacciones de oscurecimiento secundarias, o bien, por una reacción directa con la enzima.

También se han probado sales azufradas como el metabisulfito de potasio y el sulfito ácido de sodio. Se cree que tales sales forman un complejo con el fenol parcialmente oxidado, inhibiendo de esta manera el oscurecimiento enzimático<sup>45</sup>.

Se ha demostrado que la L-cisteína es un buen inhibidor de las polifenoloxidasas del aguacate. En concentraciones mayores, la glicina, diglicina y triglicina ofrecen una buena protección contra el oscurecimiento de la pulpa de aguacate. La interacción de las quinonas con ciertos aminoácidos produce un cambio substancial en la cantidad de melaninas coloreadas que, de otra forma, se forman por acción de las polifenoloxidasas en los substratos fenólicos. Además, ciertos aminoácidos son también capaces de formar quelatos con cobre, dando por resultado la inhibición de la actividad de la polifenoloxidasas<sup>47</sup>.

Por último, se ha probado que el ácido cítrico en altas concentraciones inhibe en aguacates la actividad enzimática de oxidación<sup>45</sup>. También, se ha encontrado que algunas sales de calcio (el arseniato de calcio dio los mejores resultados) suprimen la oxidación de polifenoles y reducen el contenido total de compuestos fenólicos<sup>44</sup>.

### III. Desarrollo experimental.

#### 3.1 Material y equipo.

Material de vidrio común  
Termómetro de mercurio  
Equipo para filtrado a vacío  
Balanza analítica (Sauter)  
Centrifuga  
Conductímetro (YSI)  
Potenciómetro (Corning)  
Espectrofotómetro (Bausch & Lomb)

#### 3.2 Reactivos.

Cloruro de potasio R.A.  
Acetona Q.P.  
Agua destilada  
Fosfato ácido de potasio R.A.  
Fosfato diácido de sodio R.A.  
Ácido fosfórico R.A.  
Sulfato de amonio 99% puro  
Azul brillante de Coomassie G250  
Ácido clorhídrico al 30%  
Albúmina de huevo R.A.  
Cloruro de sodio Q.P.  
Catecol (1,2-dihidroxibenceno) 99% puro  
4-Metilcatecol (1,2-dihidroxi-4-metilbenceno) 99% puro  
Dopamina (clorhidrato de 1,2-dihidroxi-4-{2-propilamina}benceno  
ó 3-hidroxitiramina) Q.P.  
Pirogalol (1,2,3-trihidroxibenceno) Q.P.

### 3.3 Experimentación.

#### 3.3.1 Madurez de los aguacates utilizados.

Se utilizaron aguacates (*Persea americana*) de la variedad Hass conseguidos en un mercado local. A los aguacates intuitivamente maduros (color y textura de la cáscara y la pulpa, sensibilidad al tacto) se les midió la conductividad por el método descrito por Marchal et al.<sup>6</sup> y Bean et al.<sup>7</sup> para confirmar la madurez.

Como electrodo de conductividad se utilizaron dos alambres de acero inoxidable niquelado, de 0.8 mm de diámetro, apartados entre sí por 8 mm y con un largo de 1 cm. Tales alambres se conectaron al conductímetro directamente y se calibraron con una solución 7.66% (peso/peso) de KCl.

Posteriormente, los alambres se incrustaron en los aguacates en ángulo recto a la superficie. Se midió la conductividad de la pulpa de los aguacates, confirmando que las lecturas fueran estables y repetitivas en varias zonas de la fruta.

#### 3.3.2 Extracción y purificación parcial de la enzima.

Se utilizó un método basado en los descritos por Dizik y Knapp<sup>40</sup>, por Golan et al.<sup>39</sup> y por Khan<sup>38,42,45-47</sup>.

Se extrajo por separado la enzima de tres aguacates con conductividad similar. La pulpa obtenida del aguacate se machacó y se mezcló con 250 ml de acetona fría (-20°C), agitando durante 5 a 10 minutos. Los sólidos residuales se filtraron al vacío. La operación se repitió 3 o 4 veces más con porciones aproximadas de 150 ml de acetona a -20°C.

### 3.3 Experimentación.

#### 3.3.1 Madurez de los aguacates utilizados.

Se utilizaron aguacates (*Persea americana*) de la variedad Hass conseguidos en un mercado local. A los aguacates intuitivamente maduros (color y textura de la cáscara y la pulpa, sensibilidad al tacto) se les midió la conductividad por el método descrito por Marchal et al.<sup>6</sup> y Bean et al.<sup>7</sup> para confirmar la madurez.

Como electrodo de conductividad se utilizaron dos alambres de acero inoxidable niquelado, de 0.8 mm de diámetro, apartados entre sí por 8 mm y con un largo de 1 cm. Tales alambres se conectaron al conductímetro directamente y se calibraron con una solución 7.66% (peso/peso) de KCl.

Posteriormente, los alambres se incrustaron en los aguacates en ángulo recto a la superficie. Se midió la conductividad de la pulpa de los aguacates, confirmando que las lecturas fueran estables y repetitivas en varias zonas de la fruta.

#### 3.3.2 Extracción y purificación parcial de la enzima.

Se utilizó un método basado en los descritos por Dizik y Knapp<sup>40</sup>, por Golan et al.<sup>39</sup> y por Khan<sup>38,42,45-47</sup>.

Se extrajo por separado la enzima de tres aguacates con conductividad similar. La pulpa obtenida del aguacate se machacó y se mezcló con 250 ml de acetona fría (-20°C), agitando durante 5 a 10 minutos. Los sólidos residuales se filtraron al vacío. La operación se repitió 3 o 4 veces más con porciones aproximadas de 150 ml de acetona a -20°C.

La solución del primer lavado de acetona es de un color verde intenso, las soluciones de los lavados posteriores eran de color verde claro o amarillo. El sólido insoluble final fue de un color blanco amarillento casi totalmente libre de grasa. El objetivo de realizar las extracciones con acetona fue el de eliminar principalmente los lípidos, los pigmentos y algunos otros materiales solubles distintos de la enzima buscada.

Los sólidos ("extracto cetónico") se secaron totalmente en una campana desecadora con succión de vacío. Se guardaron en congelador (-15°C) hasta su utilización.

Los sólidos obtenidos se suspendieron en una solución buffer de fosfatos 0.1 M de pH = 6.5 (5 gramos por cada 100 ml de buffer). La mezcla se agitó magnéticamente durante 3 a 4 horas, con el fin de disolver la enzima polifenoloxidasasa en la solución acuosa. Los sólidos residuales se separaron por centrifugación y posterior uso de un embudo de separación. El sobrenadante ("extracto enzimático crudo") era una suspensión blanca que se ponía amarillenta con el tiempo.

El extracto enzimático crudo se purificó parcialmente por precipitación agregándole sulfato de amonio lentamente y con agitación magnética hasta completar una concentración de alrededor del 50% (peso/volumen) de la sal. La solución, que se tornó más blanca, se dejó reposar por 2 a 3 horas (-15°C), dando lugar a la precipitación de la enzima. La enzima suspendida en la solución se separó por centrifugación del sobrenadante y se redisolvió en la mínima cantidad de buffer de fosfatos 0.05 M de pH = 6.5, obteniéndose una solución blanca que se dializó durante unas 12 horas en membrana de celofán contra el mismo buffer de fosfatos utilizado en la redisolución.

El extracto enzimático parcialmente purificado fue el utilizado para los ensayos de actividad enzimática posteriores. Se obtuvo un extracto adicional parcialmente purificado de alta concentración enzimática a partir de los residuos durante las otras purificaciones.

Se cuantificó la enzima en los extractos crudos y en los parcialmente purificados, basándose en el método descrito por Sedmark y Grossberg<sup>23</sup> utilizando el colorante azul de Coomassie G250.

Brevemente se describirá la metodología para la cuantificación de la enzima. Se preparó una solución (color rojo) del colorante al 0.06% (peso/volumen) en ácido clorhídrico diluido (concentración final, 0.6 N). Esta preparación se utilizó como reactivo para preparar la curva de calibración y hacer las cuantificaciones de proteína.

Las soluciones de la curva de calibración se prepararon utilizando una solución stock de albúmina de huevo al 0.1% (peso/volumen) en agua. Posteriormente, se hicieron diluciones para obtener soluciones de concentración 0.01, 0.02, ..., 0.08 y 0.09% de proteína.

Para la curva de calibración se mezclaron 5 ml de la solución del colorante con 5 ml de las soluciones de albúmina. A la mezcla (color azul) se le midió la absorbancia a 620 nm. Para los extractos enzimáticos, también se tomaron 5 ml de la solución problema y 5 ml de la solución de reacción, midiéndose la absorbancia a la misma longitud de onda.

### **3.3.3 Determinación de la actividad enzimática de la polifenoloxidasas.**

El método general de la medición de velocidades de oxidación se basó en los trabajos reportados con anterioridad<sup>38-48</sup>.

Se probó la actividad de la enzima con cuatro sustratos (1,2-dihidroxobencenos), a diferentes valores de concentración inicial de sustrato, pH, fuerza iónica y temperatura. La oxidación enzimática se siguió espectrofotométricamente en función del tiempo. Todas las quinonas (productos de la oxidación) absorbieron a 410 nm (valor generalmente reportado en la literatura) y ésta fue la longitud de onda utilizada para medir la velocidad de formación del producto de la reacción enzimática.

Tras varias pruebas preliminares se concretó el siguiente esquema general. Se combinaron en una celda espectrofotométrica de vidrio una solución de sustrato con una de buffer de fosfatos para obtener 8 ml de mezcla en las condiciones de concentración de sustrato, pH, fuerza iónica y temperatura

buscadas. La temperatura se mantuvo con un baño de agua. Se tomaron 0.4 ó 0.5 ml del extracto enzimático parcialmente purificado (dependiendo de la concentración proteica) y se agregaron rápidamente a la mezcla de reacción, poniendo en marcha un cronómetro. La celda de reacción se tapa, se voltea hacia abajo y se regresa para arriba (con el fin de mezclar la enzima), se destapa y se introduce en el espectrofotómetro. Se toman medidas de la absorbancia de la mezcla a los 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 y 150 segundos de reacción.

Se utilizaron como sustratos de la reacción los siguientes fenoles: catecol, 4-metilcatecol, dopamina y pirogalol. Dado que las soluciones de los sustratos no absorben a 410 nm, el blanco utilizado contenía 8.0 ml de buffer con la cantidad que se agregara de extracto enzimático en las soluciones de reacción.

En todos los casos las medidas cinéticas se hicieron por duplicado o triplicado y se trabajó con un promedio de las absorbancias medidas a cada tiempo.

### *3.3.3.1 MEDIDAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE SUSTRATO.*

Se utilizaron una solución de sustrato de concentración 0.1 M y una solución buffer de fosfatos de concentración 0.1 M de pH 6.5. Se hicieron mezclas con 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 ml de la solución de sustrato, completando con buffer a un volumen total de 8.0 ml. Se utilizaron 0.4 ml de extracto enzimático de concentración 2.1 mg/ml. La temperatura de reacción fue de 25°C.

### *3.3.3.2 INFLUENCIA DEL pH.*

Se utilizaron una solución de sustrato de concentración 0.02 M y soluciones buffer de fosfatos de concentración 0.1 M de pH 3.0, 6.0, 6.5, 7.0 y 8.0. Se hicieron mezclas con 4.0 ml de la solución de sustrato y 4.0 ml de la solución buffer de cada valor de pH. Se utilizaron 0.5 ml de extracto enzimático de concentración 0.5 mg/ml para las mediciones del catecol y la dopamina, y 0.4 ml de extracto enzimático de concentración 2.1 mg/ml para

las del 4-metilcatecol y el pirogalol. La temperatura de reacción fue de 25°C.

### *3.3.3.3 INFLUENCIA DE LA FUERZA IÓNICA.*

Se utilizaron una solución de sustrato de concentración 0.02 M y soluciones buffer de pH 6.5 con fuerza iónica distinta (ajustada con cloruro de sodio). Se hicieron mezclas con 4.0 ml de la solución de sustrato y 4.0 ml de la solución buffer de cada concentración salina. Se utilizaron 0.5 ml de extracto enzimático de concentración 0.8 mg/ml para las mediciones del catecol y el 4-metilcatecol, y 0.4 ml de extracto enzimático de concentración 2.1 mg/ml para las de la dopamina y el pirogalol. La temperatura de reacción fue de 25°C.

Se utilizó buffer de concentración 0.1 M con diferentes cantidades de cloruro de sodio (0.0, 0.40, 0.93, 2.70 y 4.47 g/100 ml de buffer), dando para las soluciones finales valores de fuerza iónica de 0.070, 0.11, 0.15, 0.30 y 0.45, respectivamente.

### *3.3.3.4 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.*

Se utilizaron una solución de sustrato de concentración 0.02 M y una solución buffer de concentración 0.1 M de pH . Se hicieron mezclas con 4.0 ml de la solución de sustrato y 4.0 ml de la solución buffer. Se utilizaron 0.4 ml de extracto enzimático de concentración 0.5 mg/ml. Se siguió la reacción a temperaturas de  $10\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $20\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $30\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $40\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $50\pm 3^\circ\text{C}$  y  $60\pm 4^\circ\text{C}$ .



las del 4-metilcatecol y el pirogalol. La temperatura de reacción fue de 25°C.

### *3.3.3.3 INFLUENCIA DE LA FUERZA IÓNICA.*

Se utilizaron una solución de sustrato de concentración 0.02 M y soluciones buffer de pH 6.5 con fuerza iónica distinta (ajustada con cloruro de sodio). Se hicieron mezclas con 4.0 ml de la solución de sustrato y 4.0 ml de la solución buffer de cada concentración salina. Se utilizaron 0.5 ml de extracto enzimático de concentración 0.8 mg/ml para las mediciones del catecol y el 4-metilcatecol, y 0.4 ml de extracto enzimático de concentración 2.1 mg/ml para las de la dopamina y el pirogalol. La temperatura de reacción fue de 25°C.

Se utilizó buffer de concentración 0.1 M con diferentes cantidades de cloruro de sodio (0.0, 0.40, 0.93, 2.70 y 4.47 g/100 ml de buffer), dando para las soluciones finales valores de fuerza iónica de 0.070, 0.11, 0.15, 0.30 y 0.45, respectivamente.

### *3.3.3.4 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.*

Se utilizaron una solución de sustrato de concentración 0.02 M y una solución buffer de concentración 0.1 M de pH . Se hicieron mezclas con 4.0 ml de la solución de sustrato y 4.0 ml de la solución buffer. Se utilizaron 0.4 ml de extracto enzimático de concentración 0.5 mg/ml. Se siguió la reacción a temperaturas de 10±2°C, 20±1°C, 30±2°C, 40±2°C, 50±3°C y 60±4°C.

## IV. Resultados y discusión.

### 4.1 Madurez de los aguacates utilizados.

A continuación se dan las conductividades de cada uno de los aguacates utilizados. Las lecturas fueron reproducibles en distintos polos del mismo fruto.

Tabla 4.1 Conductividad de los aguacates utilizados.

Aguacate	Conductividad (mS.cm <sup>-1</sup> )
A	528
B	466
C	528

Se ha reportado<sup>6</sup> un valor de 540 mScm<sup>-1</sup> para los aguacates de la variedad Hass en condiciones óptimas de consumo, por encima del cual se degrada su calidad. Tal valor coincide con los obtenidos experimentalmente para confirmar las propiedades organolépticas de madurez de los aguacates.

### 4.2 Extracción y purificación parcial de la enzima.

Los pesos de la pulpa de los aguacates y de los extractos cetónicos obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 4.2.1 Cantidades de extracto cetónico obtenido.

Aguacate	Peso de la pulpa (gramos)	Peso del extracto cetónico (gramos)	Porcentaje de extracto cetónico (peso/peso)
A	102.4	22.5	21.97 %
B	100.6	20.7	20.58 %
C	98.7	16.7	16.92 %

Se nota un aumento considerable en el rendimiento del extracto cetónico con respecto a la pulpa fresca, reportado para aguacates como del 6-10% para una variedad híbrida<sup>40</sup> y del 10-15% para la variedad Fuerte<sup>38</sup>.

Las concentraciones de proteína obtenidas para los extractos enzimáticos crudo y parcialmente purificado fueron las siguientes:

Tabla 4.2.2 Concentraciones de extractos enzimáticos obtenidos.

Aguacate	Extracto crudo (mg/ml)	Extracto parcialmente puro (mg/ml)
A	2.0	0.5
B	2.4	0.8
C	1.9	0.5

Los valores de las concentraciones en proteína de los extractos crudos son también superiores a los reportados en la literatura, alrededor de 0.5 mg/ml. Los extractos parcialmente purificados corresponden en concentración proteica a lo reportados<sup>38,46</sup>.

### **4.3 Determinación de la actividad enzimática de la polifenoloxidasas.**

La velocidad de reacción se define como la variación de la concentración de reactivos o productos con respecto del tiempo. El avance de reacción nunca se midió directamente sino que se hizo a través de medidas de absorbancia que, de forma proporcional, dan una medida de la concentración de producto durante la reacción.

Las velocidades de reacción sólo pueden compararse para un mismo producto debido a que la absorbancia medida de un producto durante el avance de reacción se debe no sólo a la concentración de éste sino también a su coeficiente de absorción en la longitud de onda de trabajo (característico de cada producto), por lo que no es posible determinar cuál producto se forma en mayor cantidad en un tiempo determinado sino sólo cuál absorbe más.

Las velocidades iniciales de reacción ( $V_0$ ) se determinaron graficando los logaritmos de las primeras cuatro absorbancias de reacción divididas sobre el tiempo de medición (relacionados directamente con las velocidades reales de reacción) contra el tiempo mismo. Se obtiene una recta cuya ordenada al origen se consideró el logaritmo de la velocidad inicial de la reacción.

(Los detalles para algunos de los cálculos de los valores obtenidos se muestran con ejemplos en el Anexo I).

#### **4.3.1 Medidas a diferentes concentraciones iniciales de sustrato.**

En los gráficos 4.1 a 4.4 se muestran las absorbancias de las mezclas de reacción con respecto del tiempo para diferentes concentraciones iniciales de sustrato.

### **4.3 Determinación de la actividad enzimática de la polifenoloxidasas.**

La velocidad de reacción se define como la variación de la concentración de reactivos o productos con respecto del tiempo. El avance de reacción nunca se midió directamente sino que se hizo a través de medidas de absorbancia que, de forma proporcional, dan una medida de la concentración de producto durante la reacción.

Las velocidades de reacción sólo pueden compararse para un mismo producto debido a que la absorbancia medida de un producto durante el avance de reacción se debe no sólo a la concentración de éste sino también a su coeficiente de absorción en la longitud de onda de trabajo (característico de cada producto), por lo que no es posible determinar cuál producto se forma en mayor cantidad en un tiempo determinado sino sólo cuál absorbe más.

Las velocidades iniciales de reacción ( $V_0$ ) se determinaron graficando los logaritmos de las primeras cuatro absorbancias de reacción divididas sobre el tiempo de medición (relacionados directamente con las velocidades reales de reacción) contra el tiempo mismo. Se obtiene una recta cuya ordenada al origen se consideró el logaritmo de la velocidad inicial de la reacción.

(Los detalles para algunos de los cálculos de los valores obtenidos se muestran con ejemplos en el Anexo I).

#### **4.3.1 Medidas a diferentes concentraciones iniciales de sustrato.**

En los gráficos 4.1 a 4.4 se muestran las absorbancias de las mezclas de reacción con respecto del tiempo para diferentes concentraciones iniciales de sustrato.

### CATECOL

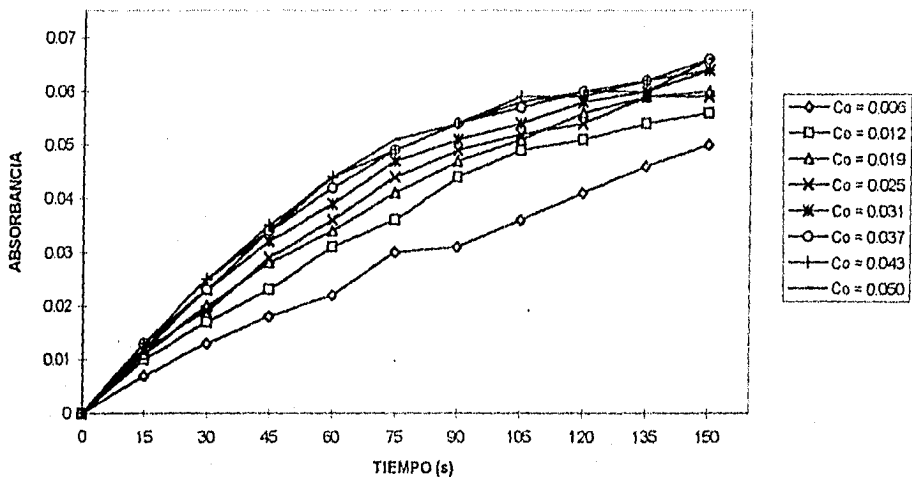


GRÁFICO 4.1 Resultados de la influencia de concentración utilizando catecol.

### 4-METILCATECOL

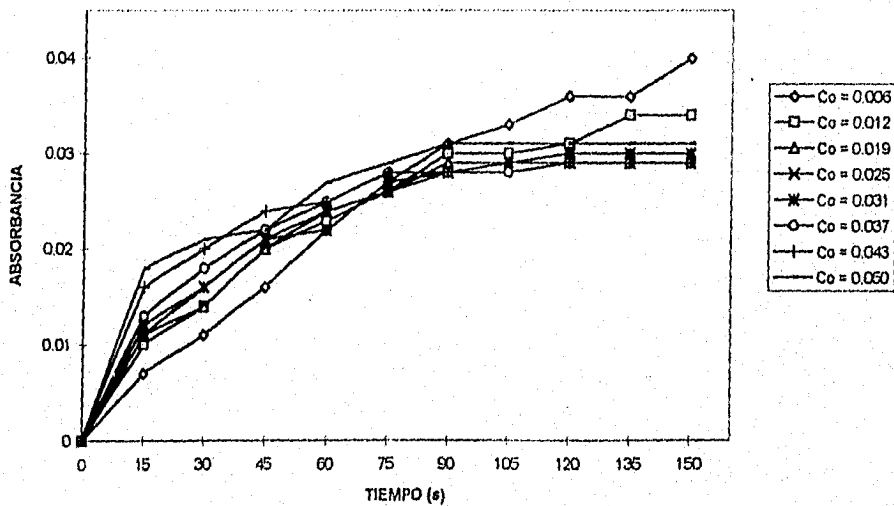


GRÁFICO 4.2 Resultados de la influencia de concentración utilizando 4-metilcatecol.

### DOPAMINA

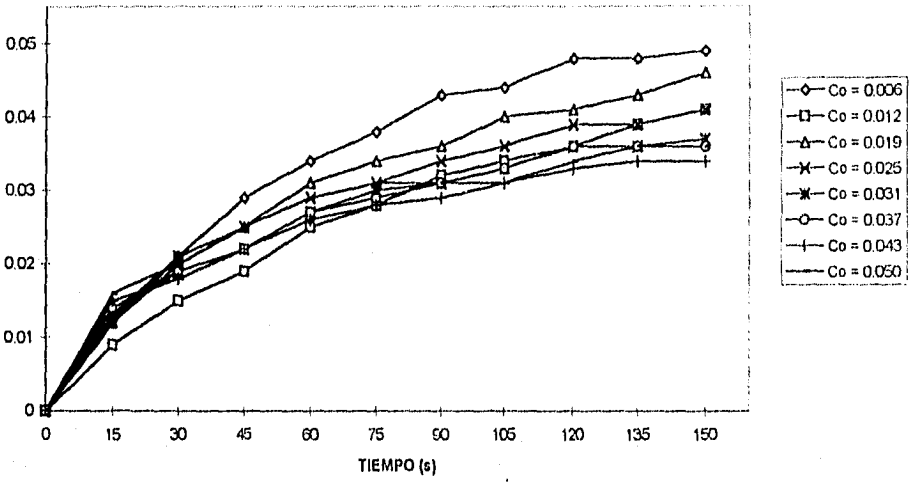


GRÁFICO 4.3 Resultados de la influencia de concentración utilizando dopamina.

### PIROGALOL

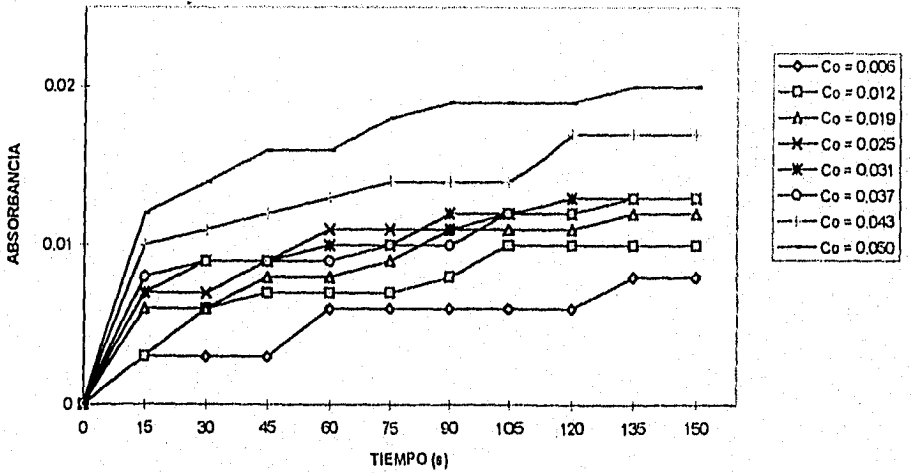


GRÁFICO 4.4 Resultados de la influencia de concentración utilizando pirogalol.

En la tabla siguiente se tienen los valores de velocidad inicial para las distintas concentraciones iniciales de los diferentes sustratos. Se muestra el coeficiente de determinación  $r^2$  para cada valor obtenido.

Tabla 4.3.1 Velocidades iniciales a diferentes concentraciones de sustrato.

$C_0$ (M)	CATECOL		4-MeCATECOL		DOPAMINA		PIROGALOL	
	$V_0$ ( $s^{-1}$ )	$r^2$	$V_0$ ( $s^{-1}$ )	$r^2$	$V_0$ ( $s^{-1}$ )	$r^2$	$V_0$ ( $s^{-1}$ )	$r^2$
0.0062	$5.1 \times 10^{-4}$	1.00	$4.7 \times 10^{-4}$	0.59	$9.6 \times 10^{-4}$	0.96	$2.0 \times 10^{-4}$	0.50
0.012	$7.0 \times 10^{-4}$	0.83	$7.4 \times 10^{-4}$	0.88	$6.6 \times 10^{-4}$	0.91	$2.6 \times 10^{-4}$	0.88
0.019	$8.0 \times 10^{-4}$	1.00	$7.9 \times 10^{-4}$	0.81	$9.1 \times 10^{-4}$	0.97	$4.9 \times 10^{-4}$	0.89
0.025	$8.2 \times 10^{-4}$	0.74	$8.8 \times 10^{-4}$	0.98	$9.6 \times 10^{-4}$	0.99	$5.3 \times 10^{-4}$	0.81
0.031	$8.7 \times 10^{-4}$	0.98	$9.2 \times 10^{-4}$	0.92	$1.0 \times 10^{-3}$	0.95	$6.3 \times 10^{-4}$	0.97
0.037	$9.1 \times 10^{-4}$	0.92	$1.0 \times 10^{-3}$	0.96	$1.1 \times 10^{-3}$	0.93	$7.5 \times 10^{-4}$	0.98
0.044	$9.2 \times 10^{-4}$	0.99	$1.4 \times 10^{-3}$	0.97	$1.2 \times 10^{-3}$	0.90	$8.7 \times 10^{-4}$	0.95
0.050	$9.2 \times 10^{-4}$	0.96	$1.5 \times 10^{-3}$	0.91	$1.3 \times 10^{-3}$	0.92	$1.1 \times 10^{-3}$	0.97

Considerando la cantidad de enzima agregada (0.84 mg) las velocidades específicas iniciales de reacción resultaron ser las siguientes:

Tabla 4.3.2 Velocidades específicas iniciales.

$C_0$ (mM)	$V_0$ (1/seg.g.enzima)			
	CATECOL	4-MeCATECOL	DOPAMINA	PIROGALOL
6.2	0.60	0.56	1.15	0.24
12	0.83	0.88	0.78	0.31
19	0.95	0.94	1.08	0.58
25	0.98	1.05	1.15	0.63
31	1.03	1.10	1.22	0.75
37	1.08	1.24	1.32	0.90
44	1.10	1.61	1.40	1.03
50	1.10	1.78	1.49	1.26

Los valores de la tabla anterior se encuentran en los gráficos 4.5 a 4.8.



### CATECOL

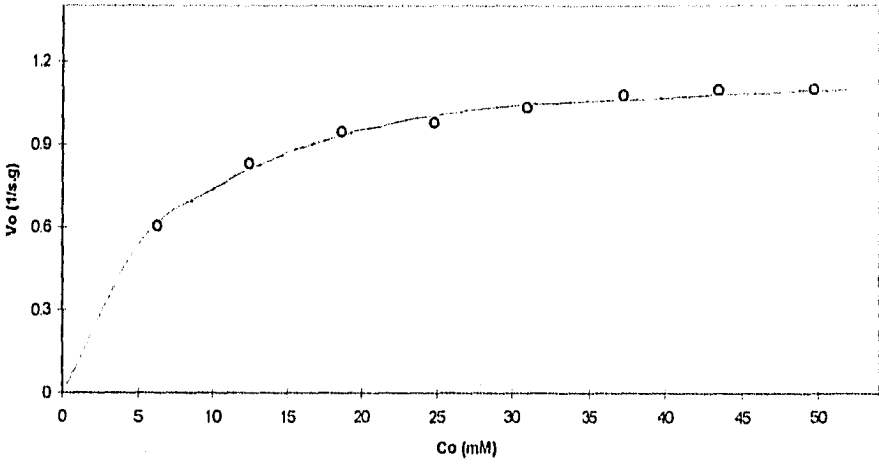


GRÁFICO 4.5 Influencia de la concentración de sustrato utilizando catecol.

### 4-METILCATECOL

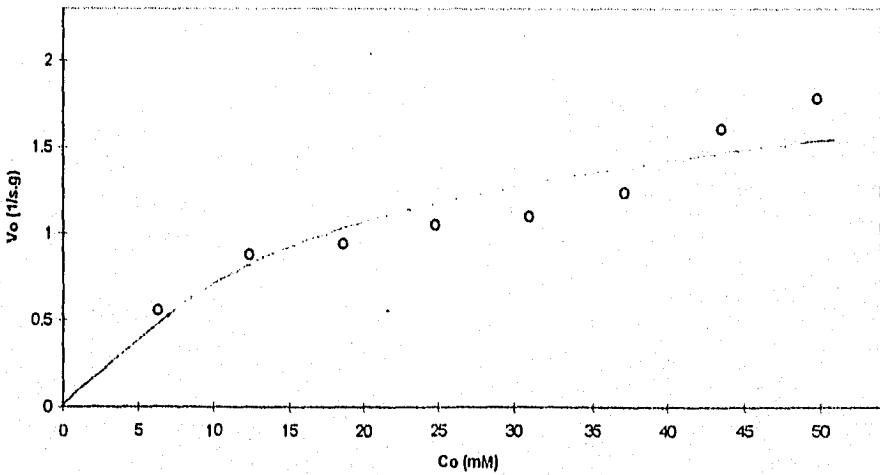


GRÁFICO 4.6 Influencia de la concentración de sustrato utilizando 4-metilcatecol.

### DOPAMINA

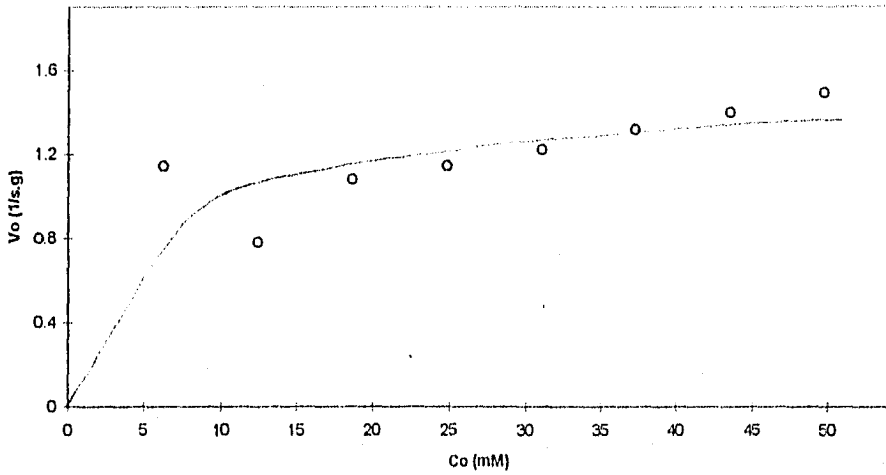


GRÁFICO 4.7 Influencia de la concentración de sustrato utilizando dopamina.

### PIROGALOL

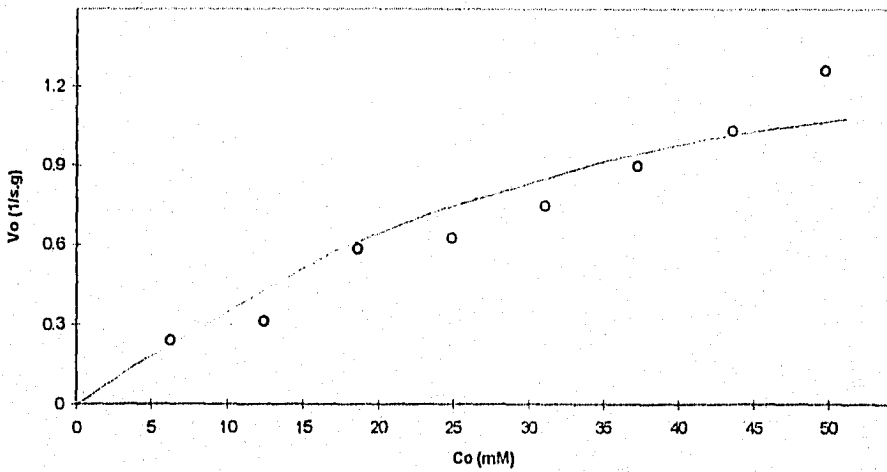


GRÁFICO 4.8 Influencia de la concentración de sustrato utilizando pirogalol.

Utilizando los métodos de Lineweaver-Burk (LB) y Eadie-Hofstee (EH), se calcularon los valores de la constante de Michaelis,  $K_m$ , y de velocidad máxima,  $V_m$ . En la tabla siguiente se muestran los valores obtenidos, acompañados por el coeficiente de determinación de la regresión lineal aplicada en cada tratamiento.

Tabla 4.3.3 Constantes cinéticas de la enzima polifenoloxidasas con diferentes sustratos.

Método	CATECOL		4-MeCATECOL		DOPAMINA		PIROGALOL	
	LB	EH	LB	EH	LB	EH	LB	EH
$r^2$	0.997	0.991	0.986	0.931	0.972	0.908	0.931	0.460
ordenada	0.790	1.261	0.650	1.510	0.492	1.962	0.590	1.615
pendiente	5.333	-6.637	7.032	-10.26	9.388	-17.41	24.01	-35.85
$V_m(s^{-1} \cdot g^{-1})$	1.3	1.3	1.5	1.5	2.0	2.0	1.7	1.6
$K_m(mM)$	6.8	6.6	11	10	19	17	41	36

Los valores obtenidos de la  $K_m$  son aproximadamente del mismo orden del de los anteriormente reportados para polifenoloxidasas de aguacates<sup>40,45</sup> y otros frutos<sup>49</sup>.

Se observa en los resultados de la tabla anterior que los valores de  $K_m$  tienen el siguiente orden decreciente: pirogalol > dopamina > 4-metilcatecol > catecol; mientras que en otros reportes para aguacates de la variedad Fuerte se observa el orden: catecol > pirogalol > 4-metilcatecol > dopamina. Sin embargo, estas diferencias no son sorprendidas ya que se ha encontrado que de una a otra variedad cambian las afinidades de la enzima polifenoloxidasas por los diferentes sustratos debido tal vez a diferencias en las proporciones de isoenzimas en el extracto utilizado.

### 4.3.2 Influencia del pH.

En los gráficos 4.9 a 4.12 se muestran las absorbancias de las mezclas de reacción con respecto del tiempo para diferentes valores de pH con los distintos sustratos.

En la tabla siguiente se tienen los valores de velocidad inicial para los distintos valores de pH. Se muestra el coeficiente de determinación  $r^2$  para cada valor obtenido.

Tabla 4.3.4 Velocidades iniciales a diferentes valores de pH.

pH	CATECOL		4-MeCATECOL		DOPAMINA		PIROGALOL	
	$V_0$ ( $s^{-1}$ )	$r^2$	$V_0$ ( $s^{-1}$ )	$r^2$	$V_0$ ( $s^{-1}$ )	$r^2$	$V_0$ ( $s^{-1}$ )	$r^2$
3.0	$4.7 \times 10^{-4}$	0.60	$1.0 \times 10^{-3}$	1.00	$3.8 \times 10^{-4}$	0.96	$2.5 \times 10^{-4}$	0.43
6.0	$4.9 \times 10^{-4}$	0.76	$1.3 \times 10^{-3}$	0.98	$5.8 \times 10^{-4}$	0.94	$6.7 \times 10^{-4}$	0.91
6.5	$6.7 \times 10^{-4}$	0.91	$1.5 \times 10^{-3}$	0.98	$6.5 \times 10^{-4}$	0.84	$9.1 \times 10^{-4}$	0.85
7.0	$1.3 \times 10^{-3}$	0.91	$1.8 \times 10^{-3}$	0.99	$8.3 \times 10^{-4}$	0.93	$9.6 \times 10^{-4}$	0.96
8.0	$8.5 \times 10^{-4}$	0.95	$7.2 \times 10^{-4}$	0.96	$6.7 \times 10^{-4}$	0.91	$6.5 \times 10^{-4}$	0.84

En el gráfico 4.13 se muestran los cambios de las velocidades iniciales relativas a los diferentes valores de pH experimentados para cada sustrato.

Se observa una reciprocidad en los resultados al observar un pH óptimo de 7 para la oxidación de todos los sustratos. Este valor difiere con el reportado<sup>45</sup> para aguacates de las variedades Fuerte y Lerman, cuyo máximo se reporta entre 5.5 y 6.5 de pH, utilizando 4-metilcatecol como sustrato. Sin embargo no es de sorprender tales diferencias de pH óptimo ya que, por ejemplo, se reportan rangos de pH desde 4 hasta 7 en diferentes variedades de uvas<sup>50,51</sup>.

### CATECOL

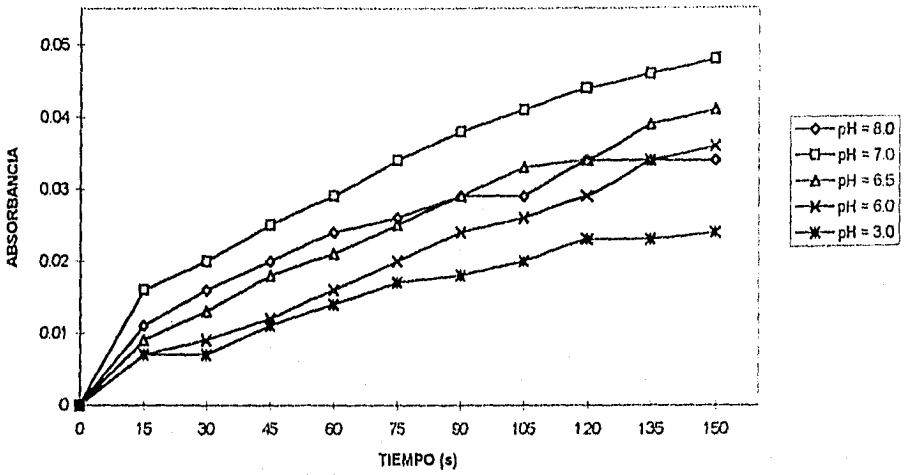


GRÁFICO 4.9 Resultados de la influencia del pH utilizando catecol.

### 4-METILCATECOL

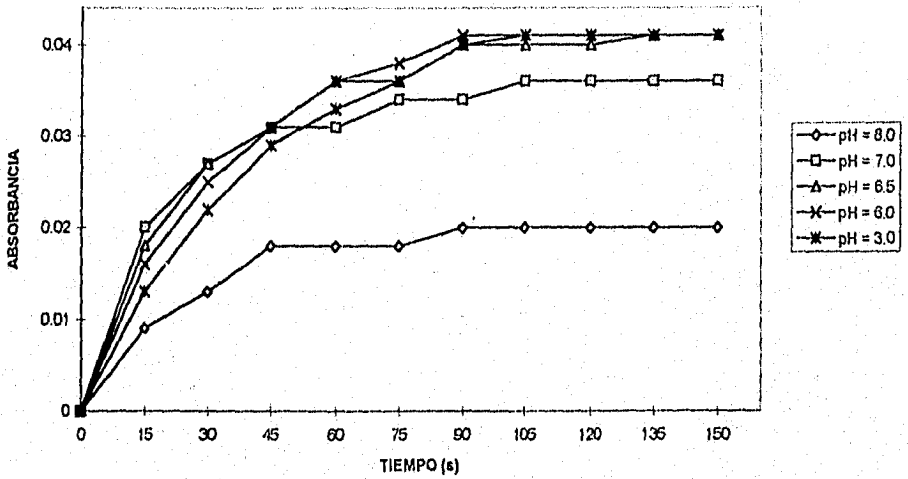


GRÁFICO 4.10 Resultados de la influencia del pH utilizando 4-metilcatecol.

### DOPAMINA

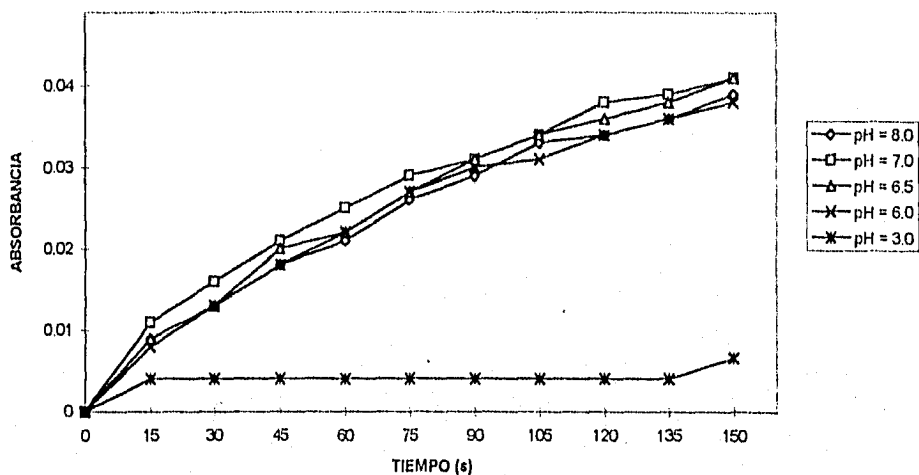


GRÁFICO 4.11 Resultados de la influencia del pH utilizando dopamina.

### PIROGALOL

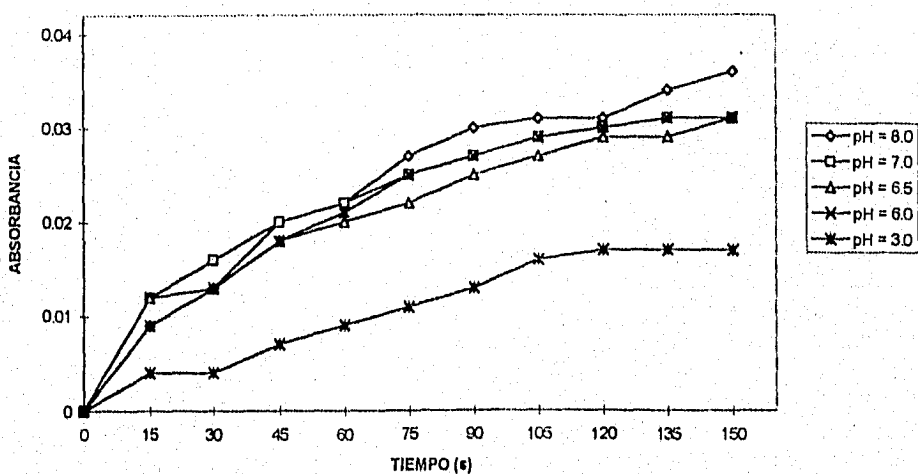
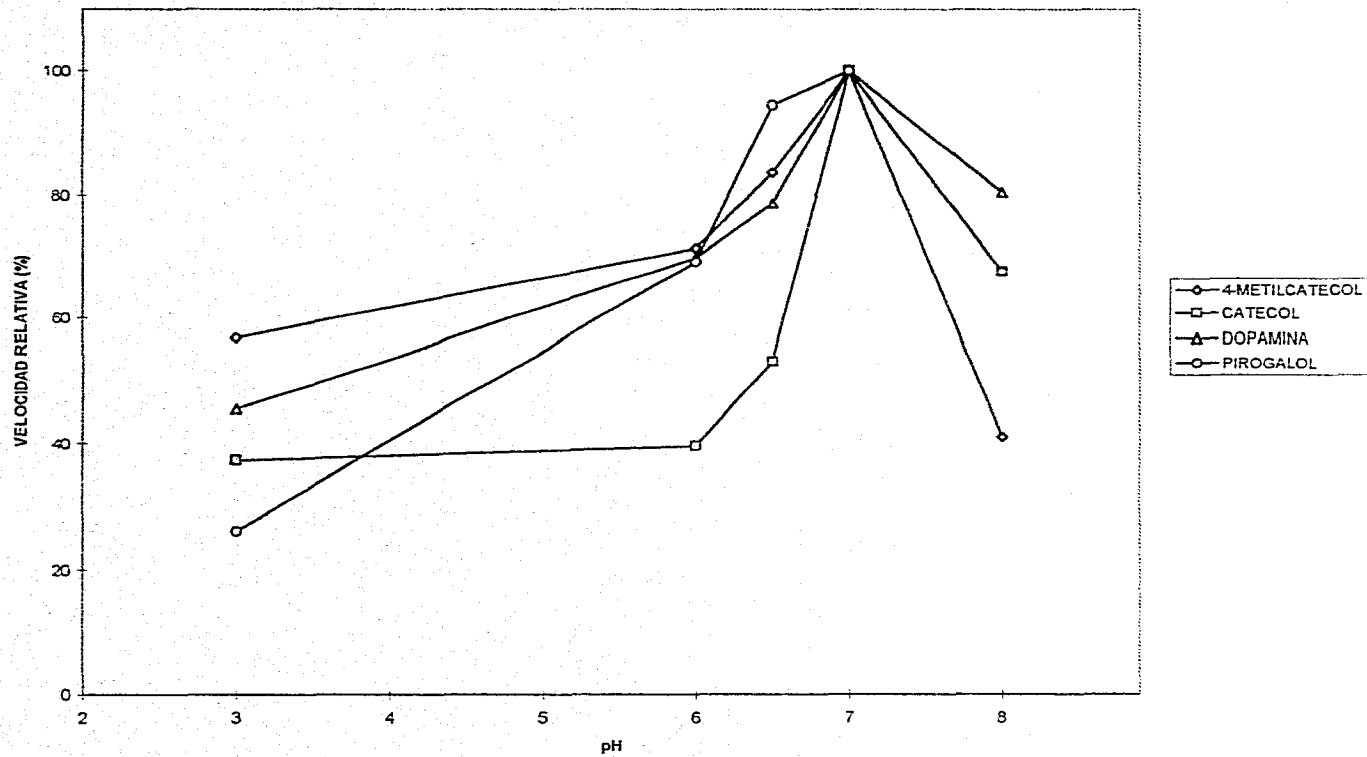


GRÁFICO 4.12 Resultados de la influencia del pH utilizando pirogalol.

GRÁFICO 4.13 Influencia del pH.



### 4.3.3 Influencia de la fuerza iónica.

En los gráficos 4.14 a 4.17 se muestran las absorbancias de las mezclas de reacción con respecto del tiempo para diferentes valores de fuerza iónica con los distintos sustratos.

En la tabla siguiente se tienen las velocidades iniciales para los distintos valores de fuerza iónica. Se muestra el coeficiente de determinación  $r^2$  para cada valor obtenido.

Tabla 4.3.5 Velocidades iniciales a diferentes valores de fuerza iónica.

I	CATECOL		4-McCATECOL		DOPAMINA		PIROGALOL	
	$V_0$ (s <sup>-1</sup> )	$r^2$	$V_0$ (s <sup>-1</sup> )	$r^2$	$V_0$ (s <sup>-1</sup> )	$r^2$	$V_0$ (s <sup>-1</sup> )	$r^2$
0.070	$1.0 \times 10^{-3}$	0.98	$1.4 \times 10^{-3}$	0.97	$1.3 \times 10^{-3}$	0.94	$6.3 \times 10^{-4}$	0.71
0.11	$8.8 \times 10^{-4}$	0.97	$1.1 \times 10^{-3}$	0.96	$6.1 \times 10^{-4}$	0.66	$4.8 \times 10^{-4}$	0.67
0.15	$9.6 \times 10^{-4}$	0.97	$1.3 \times 10^{-3}$	0.92	$7.0 \times 10^{-4}$	0.79	$5.2 \times 10^{-4}$	0.99
0.30	$1.0 \times 10^{-3}$	0.85	$1.4 \times 10^{-3}$	0.94	$8.3 \times 10^{-4}$	0.86	$5.5 \times 10^{-4}$	0.93
0.45	$1.1 \times 10^{-3}$	0.97	$1.5 \times 10^{-3}$	0.95	$9.9 \times 10^{-4}$	0.97	$6.0 \times 10^{-4}$	0.99

En el gráfico 4.18 se muestran los cambios de las velocidades iniciales relativas a los diferentes valores de fuerza iónica experimentados para cada sustrato.

Aunque no se encontraron trabajos de comparación sobre la influencia de la fuerza iónica en las velocidades de reacciones enzimáticas, es claro un patrón en los resultados obtenidos: la adición de cloruro de sodio en la solución de reacción dió una disminución en la actividad de la enzima, comparándola con la actividad de la solución que sólo tiene buffer; sin embargo, a medida que aumenta la concentración de cloruro de sodio en solución, aumenta igualmente la actividad de la enzima.



### CATECOL

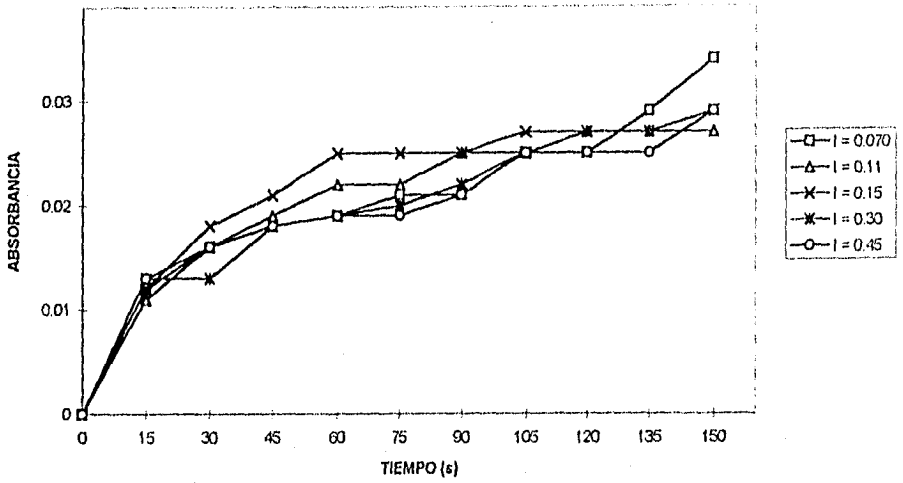


GRÁFICO 4.14 Resultados de la influencia de la fuerza iónica utilizando catecol.

### 4-METILCATECOL

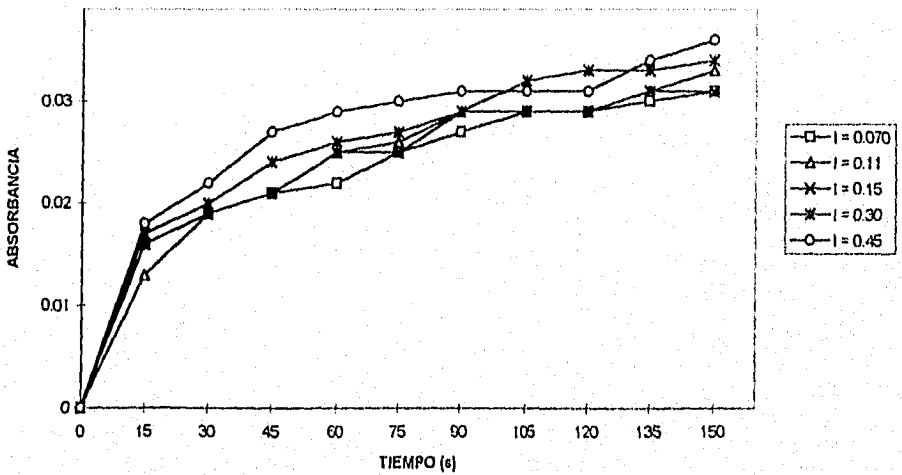


GRÁFICO 4.15 Resultados de la influencia de la fuerza iónica utilizando 4-metilcatecol.

### DOPAMINA

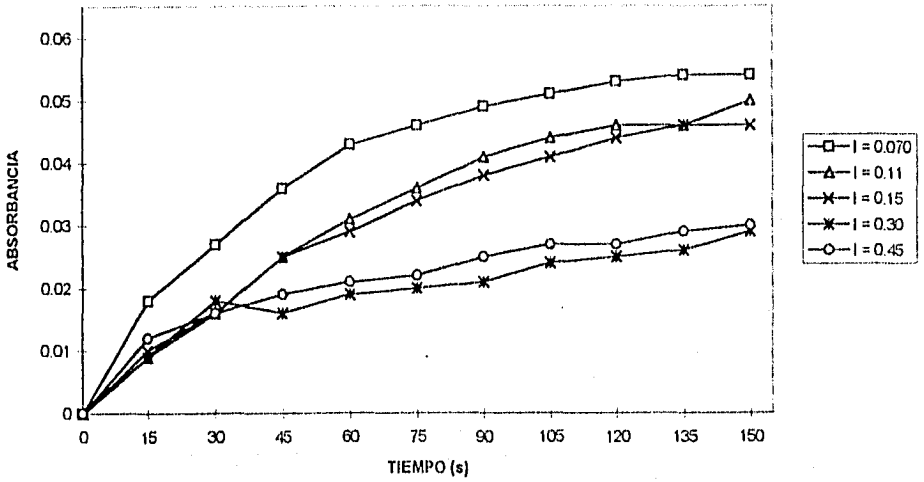


GRÁFICO 4.16 Resultados de la influencia de la fuerza iónica utilizando dopamina.

### PIROGALOL

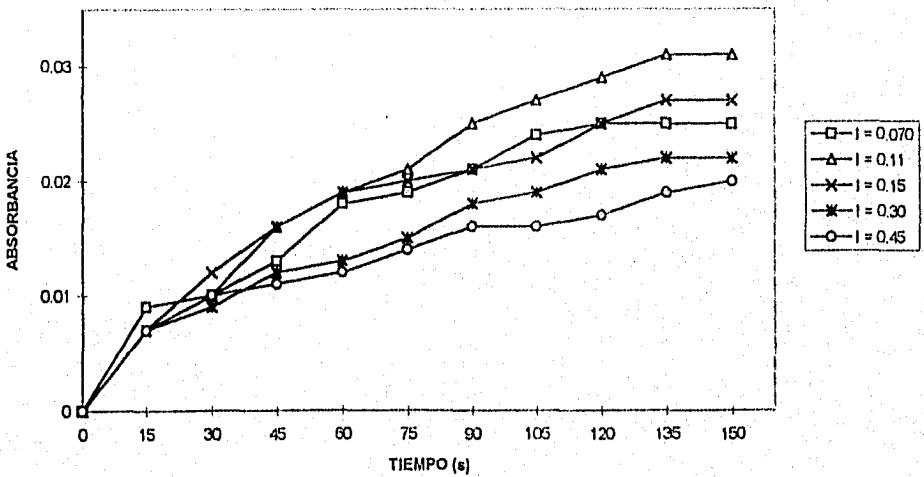
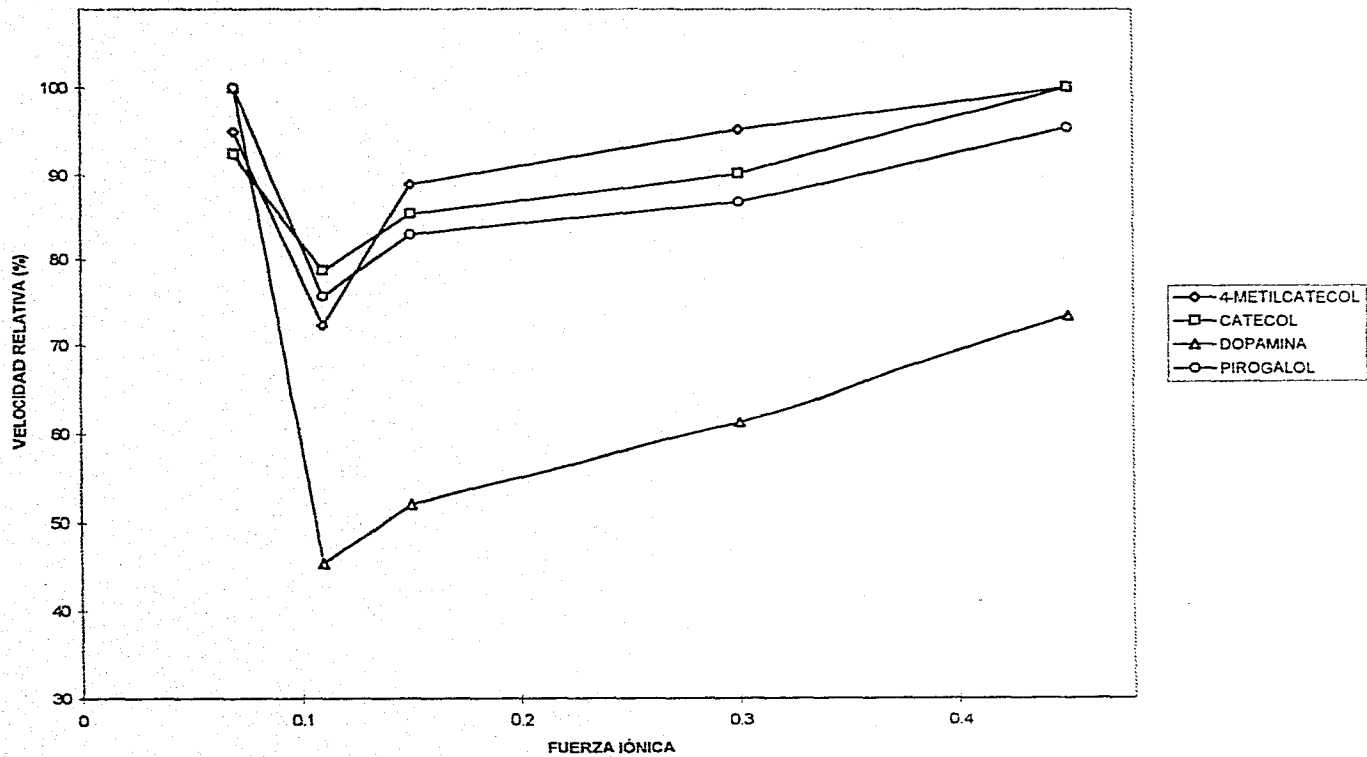


GRÁFICO 4.17 Resultados de la influencia de la fuerza iónica utilizando pirogalol.

GRÁFICO 4.18 Influencia de la fuerza iónica.



#### 4.3.4 Influencia de la temperatura.

En los gráficos 4.19 a 4.22 se muestran las absorbancias de las mezclas de reacción con respecto del tiempo para diferentes valores de temperatura con los distintos sustratos.

En la tabla siguiente se tienen las velocidades iniciales para los distintos valores de temperatura. Se muestra el coeficiente de determinación  $r^2$  para cada valor obtenido.

Tabla 4.3.6 Velocidades iniciales a diferentes valores de temperatura.

T (°C)	CATECOL		4-MeCATECOL		DOPAMINA		PIROGALOL	
	$V_0$ (s <sup>-1</sup> )	$r^2$	$V_0$ (s <sup>-1</sup> )	$r^2$	$V_0$ (s <sup>-1</sup> )	$r^2$	$V_0$ (s <sup>-1</sup> )	$r^2$
10	$5.7 \times 10^{-4}$	0.93	$5.2 \times 10^{-4}$	0.91	$5.7 \times 10^{-4}$	0.93	$6.6 \times 10^{-4}$	0.99
20	$7.8 \times 10^{-3}$	0.92	$7.2 \times 10^{-4}$	0.98	$7.3 \times 10^{-4}$	0.93	$7.3 \times 10^{-4}$	0.88
30	$9.4 \times 10^{-4}$	0.87	$8.7 \times 10^{-3}$	1.00	$1.0 \times 10^{-3}$	0.95	$8.2 \times 10^{-4}$	0.91
40	$1.1 \times 10^{-3}$	0.98	$1.0 \times 10^{-3}$	0.99	$1.3 \times 10^{-3}$	0.92	$1.0 \times 10^{-3}$	0.95
50	$1.1 \times 10^{-3}$	0.96	$1.4 \times 10^{-3}$	0.97	$1.5 \times 10^{-3}$	0.99	$1.1 \times 10^{-3}$	0.99
60	$9.0 \times 10^{-4}$	0.90	$1.3 \times 10^{-3}$	0.98	$1.4 \times 10^{-3}$	0.92	$1.1 \times 10^{-3}$	1.00

En el gráfico 4.23 se muestran los cambios de las velocidades iniciales relativas a los diferentes valores de temperatura experimentados para cada sustrato.

Se observa un valor de temperatura óptima de unos 50°C para la velocidad de reacción. A temperaturas superiores se hace visible la desnaturalización de la enzima por efecto de la temperatura, provocando una disminución en la velocidad de reacción.

Esta temperatura óptima es comparable con la de 58°C, reportada<sup>45</sup> como un máximo para la estabilidad térmica de la polifenoloxidas de aguacates de las variedades Fuerte y Lemnán. Se reporta también<sup>52</sup> un intervalo de temperatura entre 50 y 70°C de desactivación de la polifenoloxidas de ciruelas.

### CATECOL

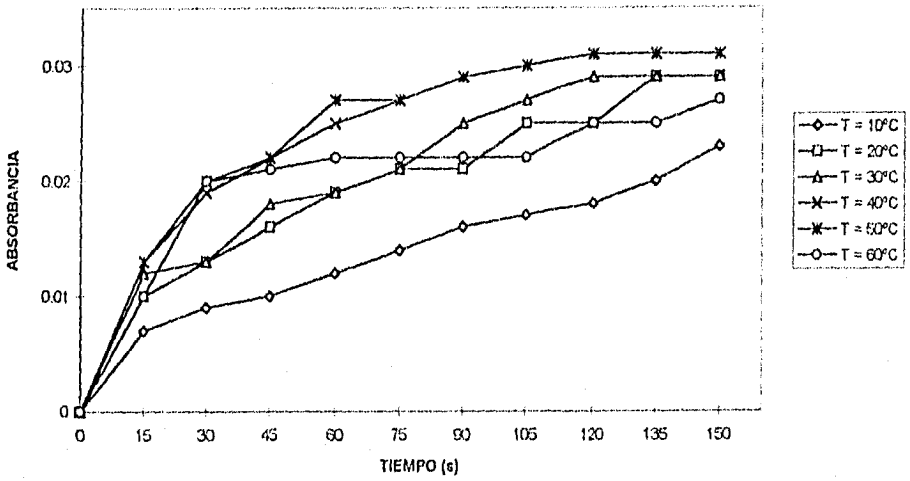


GRÁFICO 4.19 Resultados de la influencia de la temperatura utilizando catecol.

### 4-METILCATECOL

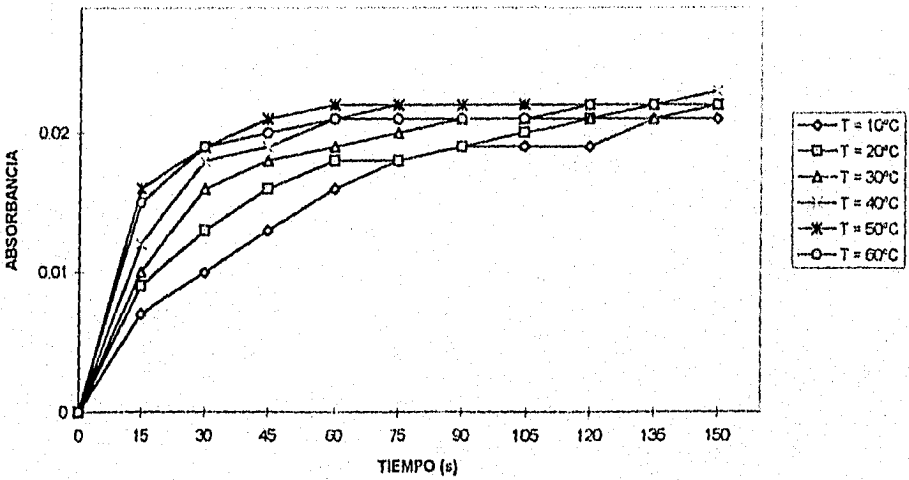


GRÁFICO 4.20 Resultados de la influencia de la temperatura utilizando 4-metilcatecol.

### DOPAMINA

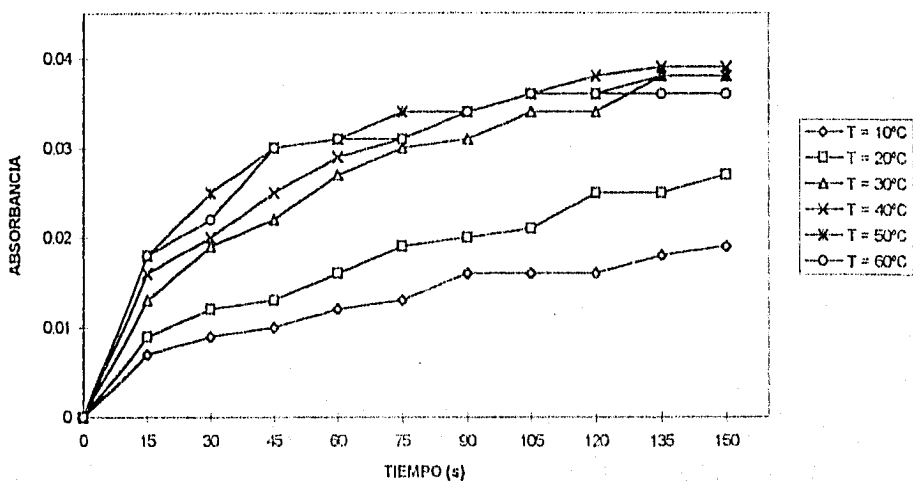


GRÁFICO 4.21 Resultados de la influencia de la temperatura utilizando dopamina.

### PIROGALOL

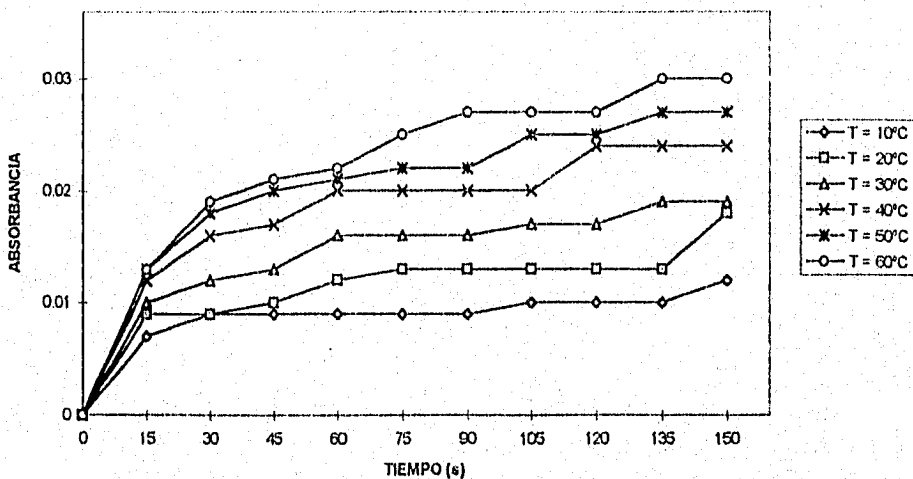
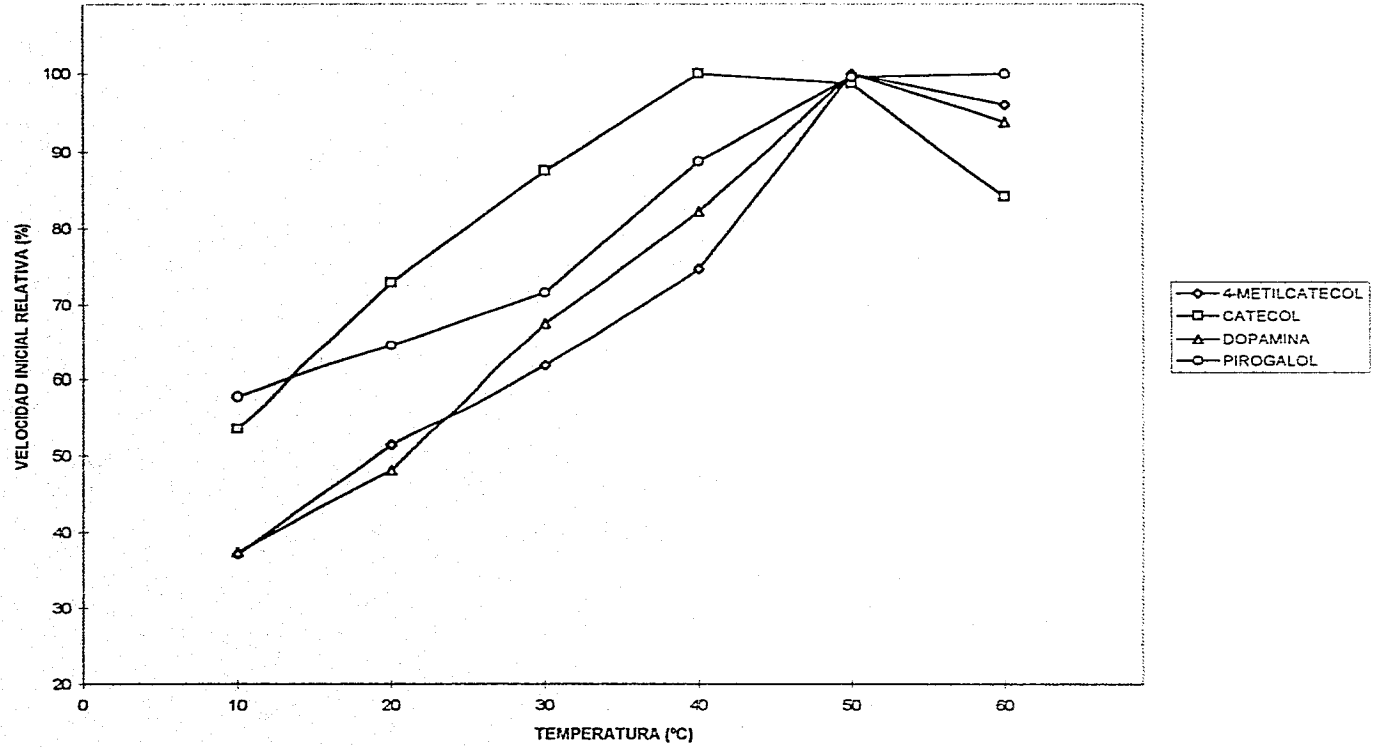


GRÁFICO 4.22 Resultados de la influencia de la temperatura utilizando pirogalol.

GRÁFICO 4.23 Influencia de la temperatura.



Se determinó la energía de activación de las reacciones enzimáticas con cada sustrato, siguiendo el procedimiento siguiente:

a) Para cada temperatura se determinaron las constantes de velocidad para las reacciones de oxidación considerándolas de orden 1.

Para  $n = 1$ , se obtiene una recta con pendiente igual a la constante de velocidad cuando se gráfica  $\ln(A_0 / A)$  contra  $t$ , donde  $A_0$  y  $A$  son las concentraciones del sustrato inicial y al tiempo  $t$ , respectivamente.

En este caso se desconocen las concentraciones exactas a cada tiempo, pero se trabajó con valores de absorbancia que son proporcionales a tales concentraciones y dado que la constante de velocidad para orden 1 no tiene unidades de concentración. Se consideró  $A_0$  para cada sustrato como la absorbancia a tiempo infinito determinada por el método de Swinbourne para la reacción de más avance (entre 40 y 60°C). Se consideró  $A$  como la diferencia entre  $A_0$  y el valor de la absorbancia medida en ese tiempo.

Se graficó la diferencia de  $\ln(A_0) - \ln(A)$  contra el tiempo  $t$  para los primeros 60 a 90 segundos de reacción, y se obtuvo la pendiente de la recta (constante de reacción).

b) Utilizando la ecuación de Arrhenius, se obtuvo una gráfica de  $\ln k$  contra  $1 / T$  para las primeras cuatro temperaturas de trabajo (283 a 313°C). Se obtuvo una gráfica cuya pendiente es igual a  $-E_a / R$ .

A continuación se muestra una tabla con los valores de constante de reacción obtenidos de cada sustrato para cada temperatura.



Tabla 4.3.7 Constantes de velocidad a diferentes valores de temperatura.

T (°C)	CATECOL		4-MeCATECOL		DOPAMINA		PIROGALOL	
	k (s <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>	k (s <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>	k (s <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>	k (s <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>
10	5.8x10 <sup>-3</sup>	0.98	1.8x10 <sup>-2</sup>	0.99	2.9x10 <sup>-3</sup>	0.99	1.7x10 <sup>-3</sup>	0.60
20	1.0x10 <sup>-2</sup>	0.96	2.3x10 <sup>-2</sup>	1.00	5.0x10 <sup>-3</sup>	0.98	3.1x10 <sup>-3</sup>	0.92
30	1.3x10 <sup>-2</sup>	0.93	2.6x10 <sup>-2</sup>	0.95	1.1x10 <sup>-2</sup>	0.98	6.6x10 <sup>-3</sup>	0.95
40	2.3x10 <sup>-2</sup>	0.99	3.3x10 <sup>-2</sup>	0.96	1.3x10 <sup>-2</sup>	0.99	1.1x10 <sup>-2</sup>	0.96
50	2.4x10 <sup>-2</sup>	0.96	4.4x10 <sup>-2</sup>	0.94	1.2x10 <sup>-2</sup>	0.97	8.1x10 <sup>-3</sup>	0.92
60	1.6x10 <sup>-2</sup>	0.79	1.8x10 <sup>-2</sup>	0.97	1.2x10 <sup>-2</sup>	0.90	1.6x10 <sup>-2</sup>	0.91

Finalmente, en la siguiente tabla se tienen los valores de energía de activación obtenidos para las reacciones enzimáticas para cada sustrato.

Tabla 4.3.8 Energías de activación de la reacción con la enzima polifenoloxidasasa.

	E <sub>a</sub> (kJ.mol <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>
CATECOL	33	0.981
4-METILCATECOL	14	0.980
DOPAMINA	40	0.954
PIROGALOL	47	0.994

Se observan valores de energía que, a excepción de la reacción con 4-metilcatecol, caen dentro del intervalo para reacciones enzimáticas<sup>53</sup>, de 25 a 50 kJ/mol. Los valores se comparan también con los encontrados para reacciones con polifenoloxidasasa de langosta<sup>54</sup>, con valores entre 32 y 51 kJ/mol. Sin embargo, se reporta también<sup>53</sup> un valor de 6.5 kJ/mol para la oxidación de 4-metilcatecol con polifenoloxidasasa de manzanas, inferior incluso al valor aquí obtenido.

#### **4.4 Alcances y perspectivas.**

La labor en este trabajo no ha sido exhaustiva. Se tienen los primeros resultados que dan una muy buena visibilidad de las actividades que han de seguir a esta obra.

Se ha logrado obtener una buena cantidad de información con relación a algunas condiciones que afectan la cinética de la reacción de oxidación de los polifenoles del aguacate. Sin embargo, falta proponer y probar un buen número de inhibidores de la enzima polifenoloxidasas.

Además, es necesario recordar que las condiciones experimentales que se han tenido difieren de las condiciones naturales de reacción, por lo que es también importante probar cinéticas de la oxidación en la pulpa misma del aguacate.

Se propone entonces un nuevo campo de investigación por demás interesante. Desde el estudio exhaustivo de la cinética y los mecanismos de la reacción de oxidación hasta la proposición de sustancias que inhiban la acción enzimática. Desde la composición de la pulpa del aguacate hasta la naturaleza bioquímica de la enzima polifenoloxidasas. Desde la proposición de nuevas técnicas de la conservación del fruto hasta el establecimiento de procesos industriales de manufactura de alimentos a base de aguacate. Todo esto no sólo con el fin de aprovechar un producto natural de gran importancia en nuestro país, sino con el simple propósito de satisfacer la curiosidad, siempre viva, del hombre hacia la naturaleza.

## V. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos y anteriormente analizados y de acuerdo con los objetivos al inicio planteados, es posible concluir que:

- Se ha utilizado una buena metodología para la extracción y purificación de la enzima polifenoloxidasas de los aguacates de la variedad Hass. El proceso no requiere de reactivos ni instrumentación complicados y da concentraciones favorables de enzima para su posterior uso en los estudios cinéticos.
- Se tienen los parámetros  $K_m$  y  $(V_0)_{máx}$  de la oxidación enzimática de los fenoles: catecol, 4-metilcatecol, dopamina y pirogalol.
- Independientemente del sustrato, se encontró un valor óptimo de  $pH = 7.0$  para la actividad enzimática de la enzima polifenoloxidasas.
- La velocidad inicial de la oxidación enzimática de todos los fenoles utilizados aumenta con la concentración de cloruro de sodio en solución.
- Se tiene una temperatura óptima de  $50^\circ C$  para la actividad enzimática. Se obtuvieron también los valores de la energía de activación de la reacción con cada uno de los sustratos de trabajo.

## REFERENCIAS

1. *Enciclopedia Hispánica : Macropedia, volumen I.* México, Encyclopædia Britannica Publishers, Inc., 1989.
2. *The New Enciclopædia Britannica: Micropædia , volume I.* 15 ed. Chicago, Encyclopædia Britannica, Inc., 1993.
3. PLUMA, I., J. Hernández y F. Correa. *Conservación del aguacate variedad Hass en fresco, para exportación (Tesis).* Cuautitlán Izcalli, Universidad Nacional Autónoma de México-Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, 1987.
4. HOLLAND, B., I.D. Unwin y D. H. Buss. *Fruits and nuts. The first supplement to McCance & Widdowson's The Composition of Foods.* Cambridge, The Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1992.
5. WILLIS, R. et al. *Postharvest. An introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables.* 3 ed. New York, Van Nostrand Reinhold, 1989.
6. MARCHAL, J. et al. *Evolution de quelques caractères physico-chimiques de l'avocat après sa récolte.* *Fruits*, 38(12):1983. p.821.
7. BEAN, R., J. Razor y G. Porter. *Changes in electrical characteristics of avocado during ripening.* *Calif. Avocado So., Yearbook* , 44:1960. p.75.
8. BEAN, R. *Avocado maturity studies: a discussion of possible applications of various physical measurements to non-destructive testing.* *Calif. Avocado So., Yearbook* , 46:1962. p.94.
9. LOZANO, Y., J. Ratovohery y E. Gaydou. *Etude de caractéristiques pomologiques et physico-chimiques de divers cultivars d'avocats produits en Corse.* *Fruits*, 42(5):1987. p.305.
10. LÓPEZ, A. y R. Quintero (compiladores). *Tecnología enzimática. Aplicaciones en alimentos y medicina.* México, Universidad Nacional Autónoma de México, 1987.
11. LEHNINGER, A. *Biochemistry.* 2 ed. New York, Worth Publishers, Inc., 1975.
12. ROSSMANN, G y P. Argos. *Protein folding.* *Ann. Rev. Biochem.*, 50:1981. p.497.

13. VAINSHTEIN, B. *Three-dimensional structure of the enzyme catalase.* *Nature*, 293:1981. p.411.
14. CREGHTON, T. *Conformational restrictions on the pathway of folding and unfolding of the pancreatic trypsin inhibitor.* *J. Mol. Biol.*, 113:1977. p.275.
15. MUSICK, W. y M. Rossmann. *The structure of mouse testicular lactate dehydrogenase isoenzyme C<sub>4</sub> at 2.9 Å resolution.* *J. Biol. Chem.*, 254:1979. p.7611.
16. O'SULLIVAN, W. y M. Gohn. *Nucleotide specificity and conformation of the active site of creatine kinase.* *J. Biol. Chem.*, 241:1966. p.3116.
17. LUDWIG, M. et al. *The structure of carboxypeptidase a.IV. Preliminary results at 2.8 Å resolution and substrate complex at 6 Å resolution.* *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 57:1967. p.511.
18. MONOD, J., J. Wyman y J. Changeux. *On the nature of allosteric transitions: a plausible model.* *J. Mol. Biol.*, 12:1965. p.88.
19. ROBYT, J. y B.White. *Biochemical techniques. Theory and practice.* Monterey, California, Brooks/Cole Publishing Company, 1987.
20. LOWRY, O. et al. *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* *J. Biol. Chem.*, 193:1951. p.265.
21. BRADFORD, M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* *Anal. Biochem.*, 72:1976. p.248.
22. SEDMAK, J. y S. Grossberg. *A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250.* *Anal. Biochem.*, 79:1977. p.544.
23. DIAZ PEÑA, M. y A. Muntaner. *Química física.* 2 ed. Madrid, Alhambra, 1984.
24. ATKINS, P. *Fisicoquímica.* México, Fondo Educativo Interamericano, 1986.
25. LEVINE, I. *Fisicoquímica.* Bogotá, McGraw-Hill, 1981.
26. CHANG, R. *Physical chemistry with applications to biological systems.* 2 ed. New York, MacMillan Publishing Co., Inc., 1981.
27. ULRICH, H. (editor). *Methods of enzymatic analysis: Volume I.* 3 ed. Weinheim, Alemania, Verlag Chemie, 1983.

28. LINEWEAVER, H. y D. Burk. *The determination of enzyme dissociation constants.* *J. Am. Chem. Soc.*, 56:1934. p.1934.
29. STAUFFER, C. E. *Enzyme assays for food scientists.* New York; Avi, Nostrand Reinhold, 1989.
30. WHITAKER, J. *Principles of enzymology for the food sciences.* New York, Marcel Dekker, Inc., 1972.
31. MASON, H., W. Fowls y E. Peterson. *Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex.* *J. Am. Chem. Soc.*, 77:1955. p.2914.
32. FORSYTH, W. *Physiological aspects of curing plant products.* *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 15:1964. p.443.
33. SMITH, J. y R. Krueger. *Separation and purification of the phenolases of the common mushroom.* *J. Biol. Chem.*, 237:1962. p.1121.
34. BOUCHILLOUX, S., P. McMahon y H. Mason. *The multiple forms of mushroom tyrosinase.* *J. Biol. Chem.*, 238:1963. p.1699.
35. HAMILTON, G. *Mechanisms of two- and four- electron oxidations catalyzed by some metalloenzymes.* *Advan. Enzymol.*, 32:1969. p.55.
36. INGRAHAM, L. *Variation of the Michaelis constant in polyphenol oxidase catalyzed oxidations: substrate structure and concentration.* *J. Am. Chem. Soc.*, 79:1957. p.666.
37. MAYER, A., E. Harel y R. Ben-Shaul. *Assay of catechol oxidase. A critical comparison of methods.* *Phytochem.*, 5:1966. p.783.
38. KAHN, V. *Polyphenol oxidase activity and browning of three avocado varieties.* *J. Sci. Fd. Agric.*, 26:1975. p.1319.
39. GOLAN, A., V. Kahn y A. Sadovsky. *Relationship between polyphenols and browning in avocado mesocarp. Comparison between the Fuerte and Lerman cultivars.* *J. Agric. Food Chem.*, 25(6):1977. p.1253.
40. DIZIK, N. y F. Knapp. *Avocado polyphenoloxidase: purification, and fractionation on sephadex thin layers.* *J. Food Sci.*, 35:1970. p.282.
41. LELYVELD, L., C. Gerrish y R. Dixon. *Enzyme activities and polyphenols related to mesocarp discoloration of avocado fruit.* *Phytochem.*, 23(8):1984. p.1531.

42. KAHN, V. *Polyphenol oxidase isoenzymes in avocado*. *Phytochem.*, 15:1976. p.267.
43. SHARON-RABER, O. y V. Kahn. *Avocado mesocarp: browning potential, carotenoid content, polyphenol oxidase, catalase and peroxidase activities: comparison between six avocado cultivars*. *J. Food Sci.*, 48:1983. p.1874.
44. VAN RENSBURG, E. y A. Engelbrecht. *Effect of calcium salts on susceptibility to browning of avocado fruit*. *J. Food Sci.*, 51(4):1986. p.1067.
45. KAHN, V. *Some biochemical properties of polyphenoloxidase from two avocado varieties differing in their browning rates*. *J. Food Sci.*, 42:1977. p.38.
46. KAHN, V. *Latency properties of polyphenol oxidase in two avocado cultivars differing in their rate of browning*. *J. Sci. Fd. Agric.*, 28:1977. p.233.
47. KAHN, V. *Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on o-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana*. *J. Food Sci.*, 50:1985. p.111.
48. KAHN, V. *Effect of some phenolic compounds on the oxidation of 4-methyl catechol catalyzed by avocado polyphenoloxidase*. *J. Food Sci.*, 41:1976. p.1011.
49. SIDDIQ, M., N. Sinha y J. Cash. *Characterization of polyphenoloxidase from stanley plums*. *J. Food Sci.*, 57(5):1992. p.1177.
50. VALERO, E., R. Varón y F. García-Carmona. *Characterization of polyphenol oxidase from Airen grapes*. *J. Food Sci.*, 53(5):1988. p.1482.
51. LAMIKANRA, O., S. Kirby y M. Musingo. *Muscadine grape polyphenoloxidase: partial purification by high pressure liquid chromatography and some properties*. *J. Food Sci.*, 57(3):1992. p.686.
52. SIDDIQ, M., N. Sinha y J. Cash. *Characterization of polyphenoloxidase from stanley plums*. *J. Food Sci.*, 57(5):1992. p.1177.
53. SOTO-VALDÉZ, H. y A. Trejo-González. *Aislamiento y caracterización parcial de la enzima fenoloxidasas de manzana (*Malus domestica*, var. Anna)*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 39(2):1989.
54. FERRER, O. et al. *Phenoloxidase from the cuticle of Florida spiny lobster (*Panulirus argus*): mode of activation and characterization*. *J. Food Sci.*, 54(1):1989. p.63.

## ANEXO

### ***A. Determinación de la velocidad inicial de reacción.***

La velocidad de reacción está dada por la variación de la concentración de sustratos o productos con respecto del tiempo. Entonces, al graficar la concentración de alguna de las sustancias involucradas en la reacción contra el tiempo, la velocidad inicial de la reacción está dada por la pendiente de la tangente a la curva que resulta a tiempo  $t = 0$ .

Si se divide cada concentración de alguna de las sustancias sobre su tiempo de medición se obtiene una velocidad puntual de reacción (variación de la concentración por unidad de tiempo). Al graficar velocidades puntuales de reacción contra el tiempo se obtiene una curva cuya ordenada al origen ( $t = 0$ ) es la velocidad inicial.

En general, si se grafican los logaritmos de las primeras velocidades puntuales de reacción contra el tiempo, se obtiene una recta con ordenada al origen igual al logaritmo de la velocidad inicial. Al linearizar se obtiene un resultado menos puntual que en los casos anteriores y más de acuerdo con la realidad.

A continuación se presenta un grupo de datos experimentales para encontrar la velocidad inicial de la reacción por el último método descrito. Se presenta el aumento de absorbancia de la mezcla de reacción con respecto del tiempo; dado que sólo un producto de la reacción presenta absorbancia a la longitud de onda de medición, las lecturas de absorbancia son directamente proporcionales al avance de la reacción.



TIEMPO (s)	ABSORBANCIA
15	0.007
30	0.013
45	0.018
60	0.022
75	0.030
90	0.031
105	0.036
120	0.041
135	0.046
150	0.050

Se obtendrán las velocidades puntuales de reacción y sus logaritmos para el primer minuto de avance:

TIEMPO (s)	VELOCIDAD ( $s^{-1}$ )	LOG (V)
15	$4.667 \times 10^{-4}$	-3.331
30	$4.333 \times 10^{-4}$	-3.363
45	$4.000 \times 10^{-4}$	-3.398
60	$3.667 \times 10^{-4}$	-3.436

Graficando  $\log(\text{velocidad})$  contra tiempo, se obtienen los siguientes parámetros de recta:

$$r = -0.999$$

$$m = -2.33 \times 10^{-3}$$

$$b = -3.29$$

Se obtiene así un valor de velocidad inicial de la reacción igual a un cambio de la absorbancia de  $5.1 \times 10^{-4}$  por segundo.

**BIBLIOGRAFÍA.**

Brennan, D. y C. Tipper. *Manual de laboratorio para prácticas de fisicoquímica*. Bilbao, Urmo, 1970.

Stauffer, C.E. *Enzyme assays for food scientists*. New York; Avi, Van Nostra Reinhold, 1989.

**B. Método de Swinbourne.**

En ocasiones es necesario conocer la concentración de alguno de los productos a tiempo infinito, es decir, cuando se ha completado la reacción y todo el sustrato ha reaccionado. Muchas de las veces, el tiempo para llegar al final de la reacción requiere de mucho tiempo, por lo que es poco práctico obtenerla experimentalmente. Existen numerosos métodos matemáticos para determinar la concentración de producto a tiempo infinito

Uno de estos métodos, sencillo y que se aplica generalmente a reacciones de primer orden, es el análisis propuesto por Swinbourne. Si se asume que los datos experimentales consisten de medidas de la concentración  $C$  del producto como función del tiempo  $t$ , el procedimiento es como sigue.

Se tienen dos series de datos, una de los valores de  $C$  a tiempos  $t_1, t_2, \dots, t_n$  y otra de los valores de  $C'$  a tiempos  $t_1 + T, t_2 + T, \dots, t_n + T$ . Entonces, de la ley de velocidad integrada para reacciones de primer orden,

$$C_{\infty} - C_n = C_{\infty} \exp(-kt_n)$$

$$C_{\infty} - C'_n = C_{\infty} \exp(-k(t_n + T))$$

Dividiendo una ecuación entre la otra:

$$(C_{\infty} - C_n) / (C_{\infty} - C'_n) = \exp(kT)$$

y reorganizando,

$$C_t = C_\infty (1 - \exp(-kT)) + C'_0 \exp(-kT)$$

Así, cuando se grafica la primera serie de datos contra la segunda, se obtiene una línea recta con pendiente

$$m = -k$$

y ordenada al origen

$$b = C_\infty (1 - \exp(-kT)) = C_\infty (1 - m)$$

de donde se puede obtener la concentración del producto a tiempo infinito.

Experimentalmente,  $C$  es leída a tiempos iguales.  $T$  debe estar entre un medio y uno del valor de vida media (la vida media es el tiempo para el que  $C$  se ha formado en un 50%) y puede estimarse de los valores experimentales. Para ilustrar este tratamiento se utilizarán los siguientes datos de valores de absorbancia del producto de reacción con respecto del tiempo.

TIEMPO (s)	ABSORBANCIA
15	0.011
30	0.020
45	0.028
60	0.034
75	0.041
90	0.047
105	0.051
120	0.056
135	0.059
150	0.060

De los datos se observa que la absorbancia a tiempo infinito será mayor de 0.060, es decir, el tiempo de vida media es aproximadamente aquel en el cual se alcanza 0.034 de absorbancia. Puesto que se puede elegir una  $T$  aún un poco menor del valor de tiempo de vida media, para estos datos se tomará  $T = 60$  s. De esta forma, para  $A = 0.011$ , se tiene  $A' = 0.041$  (a tiempo de  $15 + T$ ), y así sucesivamente para completar la siguientes tabla.

$A'$	$A$
0.041	0.011
0.047	0.020
0.051	0.028
0.056	0.034
0.059	0.041
0.060	0.047

Graficando  $A'$  contra  $A$ , se obtienen los siguientes parámetros de recta:

$$\begin{aligned} r &= 0.989 \\ m &= 1.78 \\ b &= -0.063 \end{aligned}$$

Por lo que se tiene una absorbancia infinita

$$A_{\infty} = b / (1 - m) = 0.081$$

y el valor elegido de  $T$  fue correcto.

### **BIBLIOGRAFÍA.**

Stauffer, C.E. *Enzyme assays for food scientists*. New York; Avi, Van Nostra Reinhold, 1989.