

ENSAYO AUTOGRÁFICO SIMPLE PARA LA DETECCIÓN DE INHIBIDORES DE PEROXIDASA

Ramallo I. Ayelen¹, Micheloni Oscar B.², Farroni Abel E.^{2,3} y Furlan Ricardo L. E.¹

¹Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR-CONICET, Rosario, Argentina. ²Escuela de Ciencias Agrarias Naturales y Ambientales, UNNOBA, Pergamino, Argentina. ³Laboratorio de Biotecnología, Estación Experimental Agropecuaria Pergamino, INTA, Pergamino, Argentina.

aramallo@fbioyf.unr.edu.ar

Introducción: La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los alimentos más consumidos en el mundo. Durante su procesamiento sufre pardeamiento superficial, lo cual disminuye su valor comercial. Este proceso se debe, en parte, a la actividad de la enzima peroxidasa (POD),¹ por lo que su inactivación es una estrategia anti-pardeamiento.² Debido a la creciente preferencia de los consumidores por aditivos alimentarios no sintéticos, la búsqueda de agentes anti-pardeamiento en extractos vegetales está cobrando especial interés, implicando la necesidad de trabajar con mezclas complejas de compuestos. La cromatografía en capa delgada (CCD) combinada con determinación *in situ* de una actividad es un formato adecuado para el análisis dirigido por efecto de muestras complejas.³ La POD cataliza la oxidación de una gran variedad de co-sustratos donantes de electrones como el ABTS en presencia de H₂O₂. Sin embargo, el uso de la producción de ABTS^{•+} como reportero puede conducir a una subestimación de la actividad POD, si se produce una reacción entre dicho radical y compuestos antioxidantes presentes en la muestra estudiada. Este trabajo comprende el desarrollo de un ensayo autográfico con POD de papa inmovilizada en agarosa, una adaptación del ensayo⁴ ABTS^{•+} como control a fin de detectar falsos positivos durante la búsqueda de verdaderos inhibidores, y su aplicación para el estudio de dos extractos vegetales.

Resultados: Se ensayaron varios protocolos durante la puesta a punto de las condiciones del ensayo POD. Los mejores resultados se obtuvieron vertiendo sobre la placa de CCD una solución conteniendo agarosa, ABTS, H₂O₂ y POD en buffer fosfato (0,031 mmol/cm², 0,239 μmoles/cm² y 84,04 U/cm² respectivamente). El cálculo del límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) se realizó por triplicado midiendo los halos de inhibición y mediante regresiones no-lineales. La quercetina presentó un LOD de 0,16 μg y un LOQ de 0,54 μg en el ensayo POD, y un LOD de 0,15 μg y un LOQ de 0,49 μg en el ensayo control. La estabilidad del color de la matriz del ensayo POD se realizó mediante análisis de imágenes empleando el sistema *CIEL *a*b**, siguiendo la evolución de los valores de la coordenada *a** en el tiempo. El aumento de la coloración se vuelve significativo entre los 30-60 minutos. La diferencia de color total (ΔE^*ab) se empleó para medir el contraste halo/matriz. El mejor contraste se observó a los 70 minutos. El sistema desarrollado fue capaz de detectar eficientemente quercetina en un extracto de *Solidago chilensis* Meyen, en cantidades no detectadas bajo luz UV₂₅₄. Finalmente, un extracto de *Cichorium intybus* L. se analizó mediante ensayo autográfico POD y ABTS^{•+} control. Los resultados mostraron una zona más clara en la autografía POD ausente en el control, sugiriendo la presencia de compuestos que inhiben la enzima pero que no tendrían actividad antioxidante.

Conclusiones: El ensayo desarrollado puede detectar componentes inhibidores de POD de papa en mezclas complejas, y diferenciar entre inhibidores de POD puros y captadores de radicales ABTS^{•+} antes de que se inicie un fraccionamiento. La información proporcionada sería útil para tomar decisiones operativas que ahorren tiempo y recursos. Este ensayo puede ampliarse para buscar inhibidores para el pardeamiento en otros vegetales y productos alimenticios derivados.

Referencias: 1) Li, L., et al., *J. Food Process. Preserv.* **2017**, 41, e13263. 2) Tsikrika, K., et al., *J. Food Process. Preserv.*, **2022**, 46, e16298. 3) Cabezudo, I., et al. *Food Chem.*, **2022**, 390, 132937. 4) Zampini, I. C., et al., *AAPS Pharm. Sci.*, **2010**, 11, 1159–1163.