

Micheloni O.¹, Salazar M.³, Farroni A.² y Furlan R.L.F.³

¹Dto. Cs. Básicas, Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

²INTA, EEA Pergamino, Laboratorio de Biotecnología. Av. Frondizi Km 4,5 Pergamino, Buenos Aires, Argentina, CC 31 - B2700WAA TE: 54 2477 439000.

³Catedra de Farmacognosia. Facultad de Cs. Bioq. Y Farm. Universidad Nacional de Rosario

INTRODUCCIÓN

Los inhibidores de origen natural de las enzimas involucradas en el pardeamiento de frutas o verduras son un campo de estudio muy activo. Las autografías enzimáticas han demostrado ser una herramienta útil para detectar inhibidores de estas enzimas como la polifenol oxidasa (PPO).

OBJETIVO

Identificar inhibidores de PPO de manzana a partir de extractos de *Dipsacus fullonum* L.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

1.Recolección, identificación y extracción:

Se recolectaron partes aéreas en conjunto (DFtot) y los órganos aéreos por separado (hojas DFh, inflorescencia DFf y tallo DFt) de *Dipsacus fullonum* L. y se identificaron sistemáticamente.

Un ejemplar se depositó como *voucher specimen* en un herbario sistematizado en la UNR.

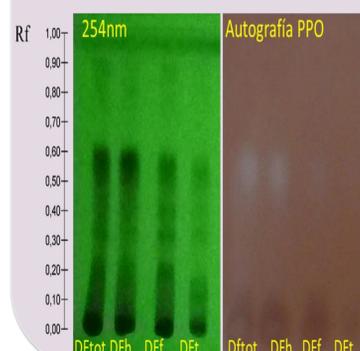
El material vegetal se secó en estufa a 40°C, se molió y se mezcló de manera homogénea. Se realizó una extracción por decocción (10', 100°C), se filtró y se liofilizó.

2. Actividad antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante

Extracto	DPPH IC ₅₀ (mg/mL)	ABTS ^{•+} IC ₅₀ (mg/mL)	CUPRAC (mg TL/gr mat. seco)	Polifenoles totales (mgGA/g mat. Seco)
DFtot	0,12±0,01 ^a	0,15±0,01 ^a	0,53±0,04 ^a	11,09±0,06 ^b
DF _h	0,10±0,01 ^a	0,085±0,004 ^b	0,30±0,01 ^b	18,66±0,03 ^d
DF _f	0,12±0,01 ^a	0,090±0,005 ^c	0,34±0,01 ^b	12,82±0,06 ^c
DFt	0,53±0,04 ^b	0,31±0,02 ^d	0,15±0,001 ^c	6,71±0,04 ^a
AA	0,016±0,001	0,01±0,01		
TL	0,0063±0,0003	0,0024±0,0002		

3.Detección de actividad inhibidora del pardeamiento enzimático por autografía



Los extractos DFtot, DFh, DFf y DFt se analizaron por autografía de polifenoloxidasa de manzana y posteriormente se los extractos positivos se cuantificaron

	DFtot	DF _h	DF _f	ac. ascórbico
IC ₅₀ (mg/ml)	2.7±0.5	3.6±0.3	4.2±0.9	0.131±0.014

4. Aislamiento Bioguiado de fracción activa



extracto acuoso de DFtot

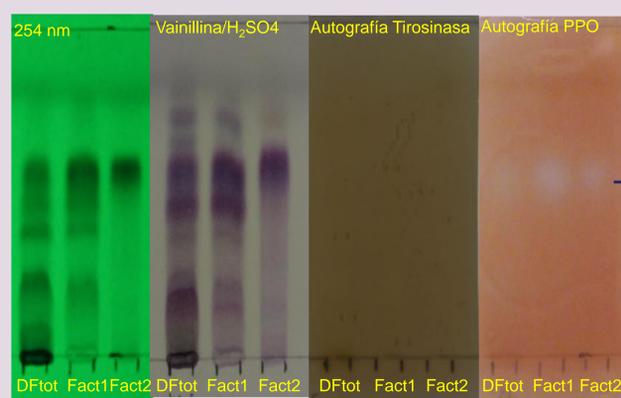
Cromatografía columna

Cromatografía preparativa 1

Fact1

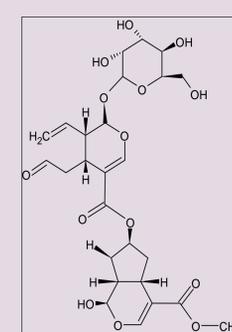
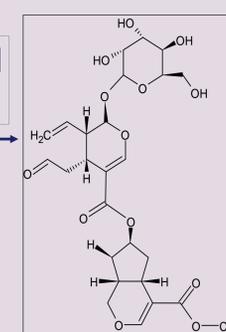
Cromatografía preparativa 2

Fact2



RMN y EM de Fact2

silvestrosidos III silvestrosido IV



Silvestrosidos III y IV (Fact2) son inhibidores selectivos de PPO de manzana (IC₅₀ 0,091±0,003 mg/mL). El efecto inhibitor observado es mayor al del ácido ascórbico (0,103±0,014 mg/mL)

CONCLUSIONES

El uso de TLC-autografía específica demostró ser una técnica rápida y precisa para detectar extractos activos y facilitar su fraccionamiento bioguiado hacia la identificación de los compuestos activos. Los resultados obtenidos ilustran cómo el uso de un test autográfico basado en la enzima del alimento en estudio puede evitar descartar una muestra interesante por falta de inhibición de un modelo de enzima. El aislamiento bioguiado a partir de DFtot condujo a una Fact2 compuesta por Silvestrosidos III y IV que mostró mayor efecto inhibitor de PPO de manzana que el ac. ascórbico .