

MICHELONI O.¹, RAMALLO IA.³, FARRONI A.², FURLAN R.L.E.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.

³Cátedra de Farmacognosia, Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. Correo electrónico: obmicheloni@comunidad.unnoba.edu.ar

INTRODUCCIÓN

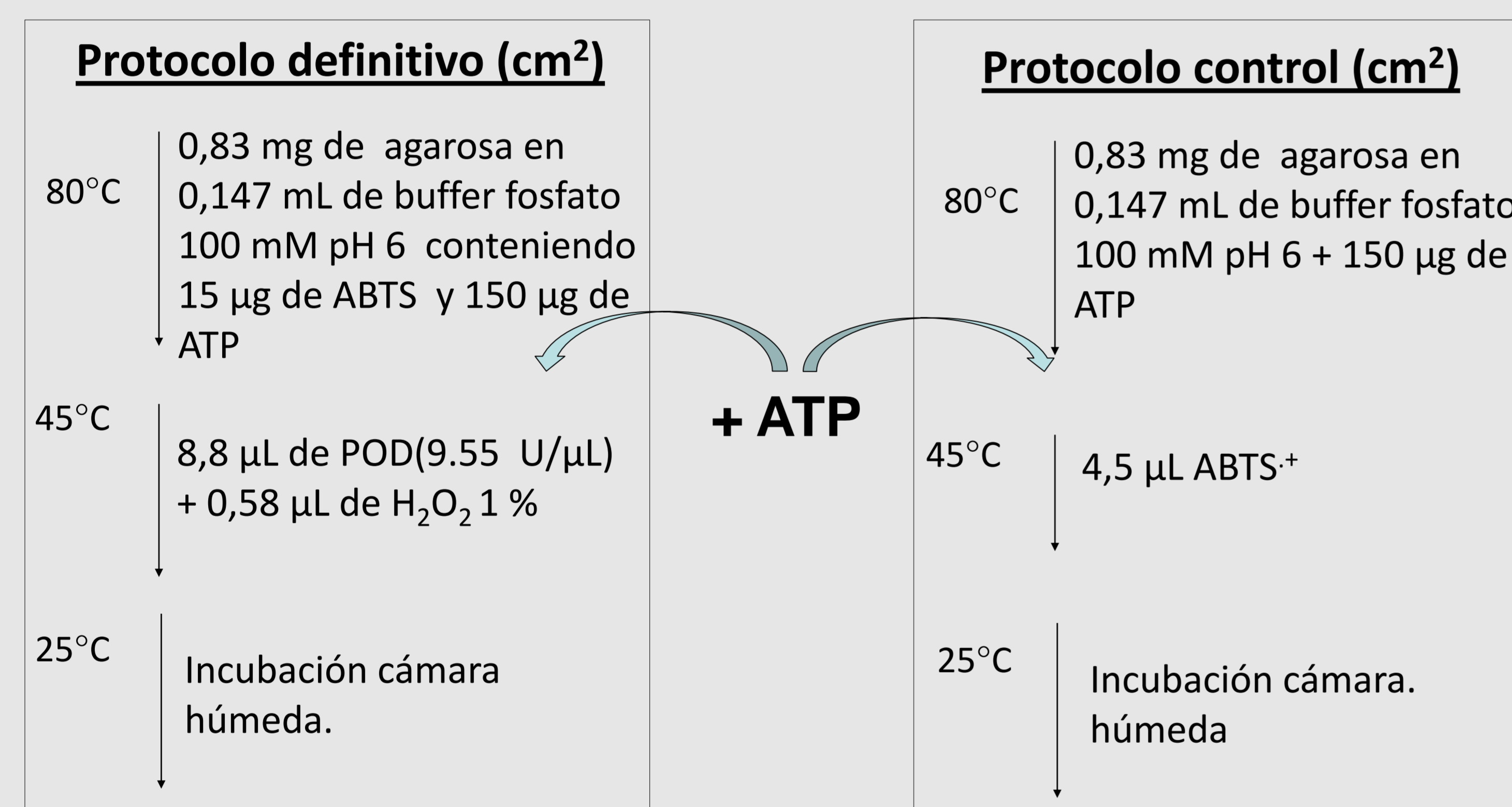
La peroxidasa (POD) está implicada en el pardeamiento de vegetales. Cataliza la oxidación de co-sustratos en presencia de H₂O₂. Las técnicas autográficas basadas en POD de papa presentan algunos inconvenientes respecto a la inestabilidad del color de la matriz dadas por la reducción del ABTS⁺, y la estandarización de forma de reportar la actividad. El indicador coloreado ABTS⁺, puede ser reducido por antioxidantes presentes en muestra llevando a subestimar la bioactividad. Por lo tanto, se hace necesaria una modificación del ensayo que lo haga más robusto frente a interferencias como la descrita.

OBJETIVOS

Introducir mejoras en el ensayo con el fin de estabilizar el color de la matriz. Desarrollar un ensayo control para identificar inhibidores reales

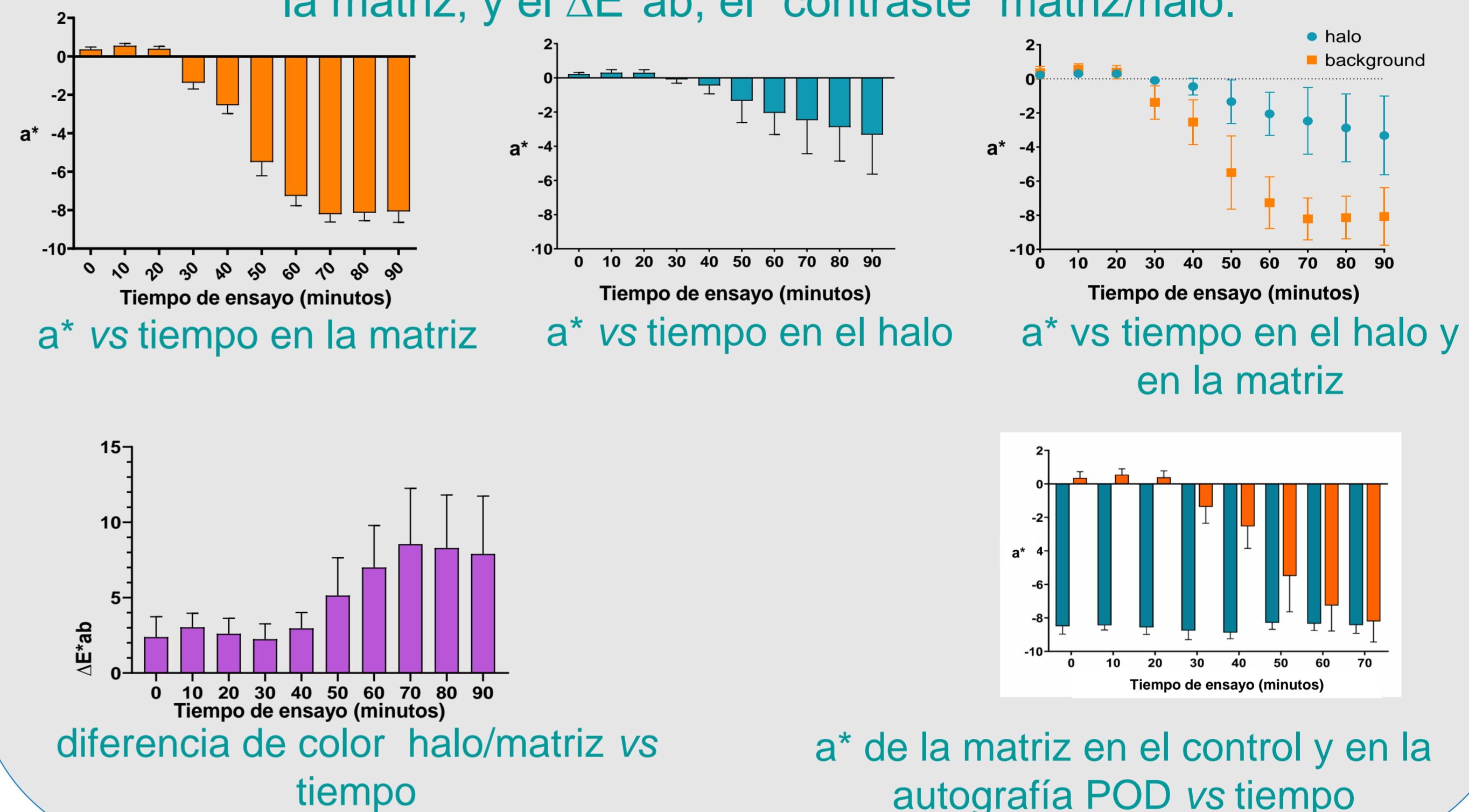
DESARROLLO EXPERIMENTAL

1. Ajuste de protocolos de POD y control (detección falsos positivos)

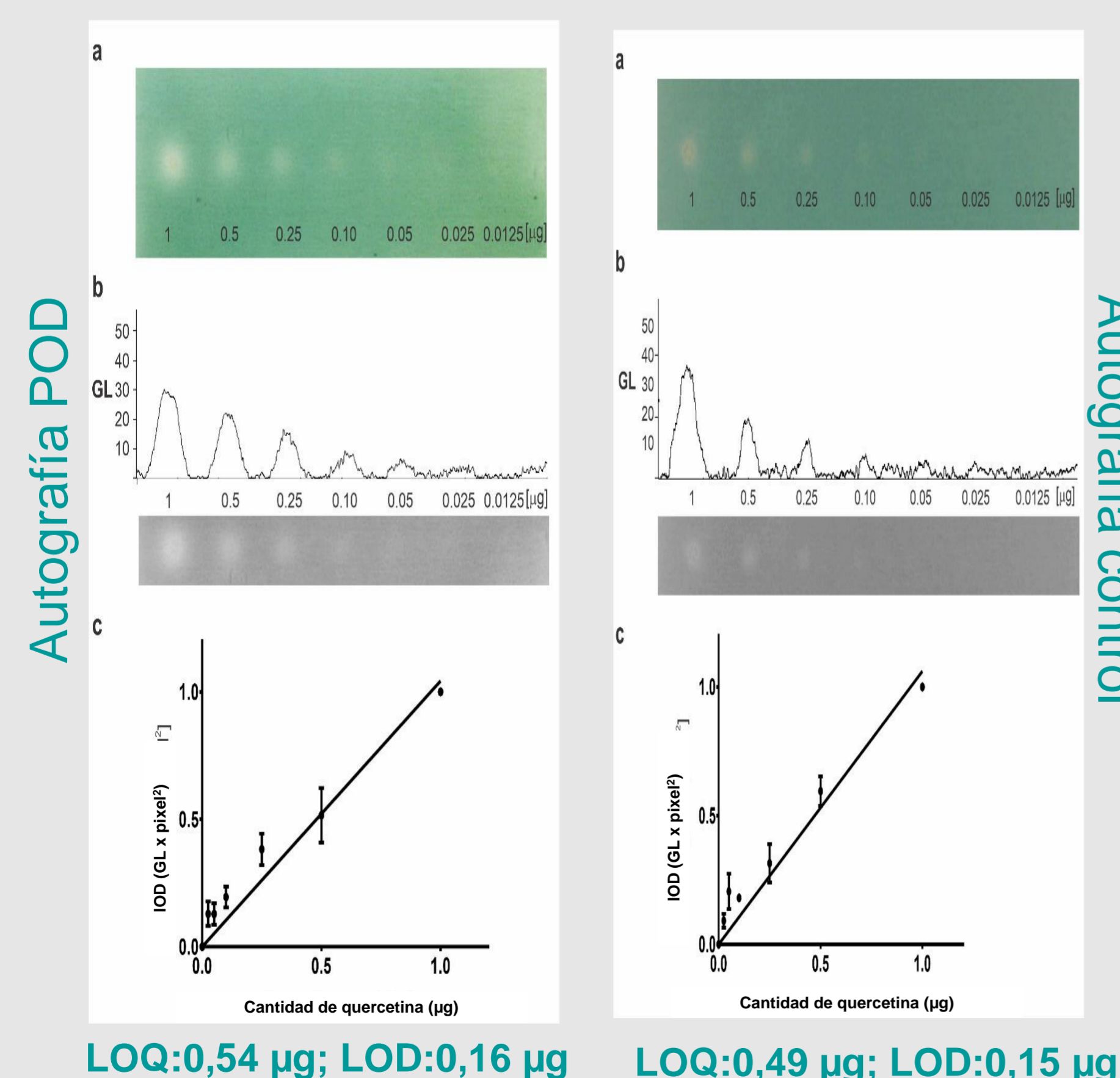


2. Selección de tiempo de lectura

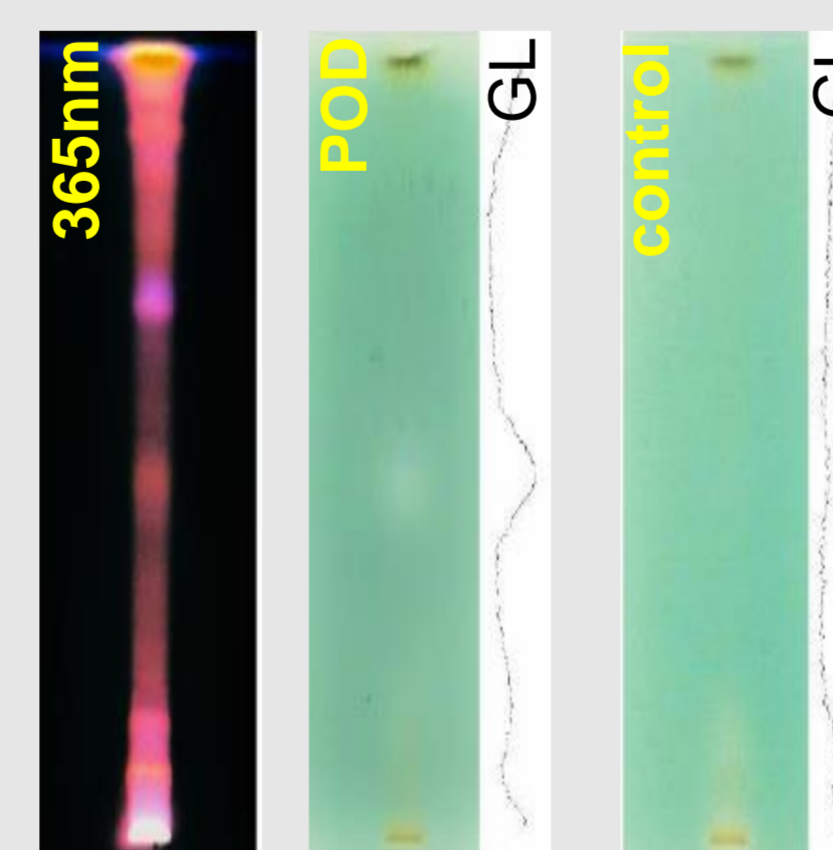
Se tomaron imágenes de ambos protocolos cada 10' durante 90', y se las analizaron con el sistema CIELAB. El valor a* midió el "verdor" de la matriz, y el ΔE*ab, el "contraste" matriz/halo.



3. Determinación Límite cuantificación (LOQ) y detección (LOD)

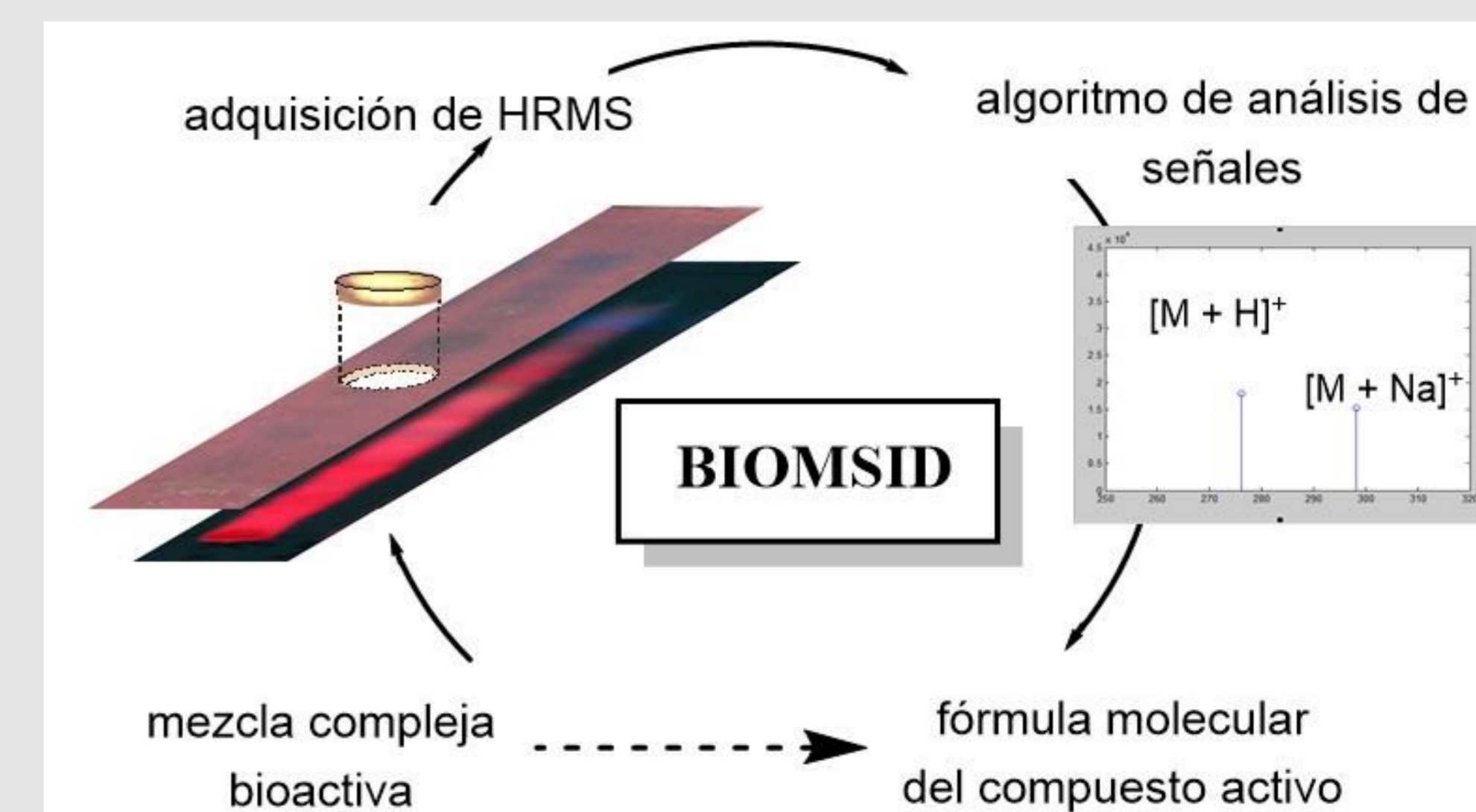


4. Aplicación a productos naturales: extracto de *Cichorium intybus* L. (achicoria)



5. Análisis con espectrometría de masa de alta resolución (HRMS)

Para estudiar los responsables de la bioactividad, se levantaron discos de la zona de la matriz y de la zona del halo de la autografía, se extrajeron con acetato de etilo, y se analizaron por infusión directa con HRMS. Los espectros se examinaron con un algoritmo en MATLAB buscando señales relacionadas al efecto. Se identificaron 5 iones como posibles responsables de la actividad m/z= 167,0326; 167,0704; 281,1005; 292,199; 405,3114



CONCLUSIONES

✓ El ensayo autográfico control ayuda a discriminar entre inhibidores puros de POD y antioxidantes en mezclas complejas. El tiempo de visualización se fijó en 70 minutos.