

## CATALASA, PEROXIDASA Y POLIFENOLOXIDASA DE PITAYA AMARILLA (*Acanthocereus pitajaya*)

### CATALASE, PEROXIDASE AND POLYPHENOLOXIDASE FROM PITAYA AMARILLA FRUITS (*Acanthocereus pitajaya*)

Jhon Alexander Castro Rivera, Lucía Estrella Baquero Duarte  
y Carlos Eduardo Narváez Cuenca\*

Recibido: 24/08/05 – Aceptado: 19/05/06

#### RESUMEN

Las enzimas catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y polifenoloxidasa (PFO) fueron extraídas de la corteza de frutos de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) y caracterizadas parcialmente. Para CAT se halló que su actividad fue máxima a pH entre 6,8 y 7,5, temperatura entre 30 a 50 °C y un  $K_M$  de 442 mM con  $H_2O_2$  como sustrato. Para POD se encontró un pH de máxima actividad entre 5,0 a 5,5, temperatura de máxima actividad entre 20 a 25 °C y valores de  $K_M$  de 10,6 mM para guaiacol y 5,1 mM para  $H_2O_2$ . Para PFO las actividades máximas se obtuvieron a pH 7,0 y a temperaturas entre 30 a 40 °C; para esta enzima se obtuvo un  $K_M$  de 5,5 mM con L-DOPA como sustrato. Las características encontradas para POD y PFO indican que estas enzimas pueden jugar un papel importante en el pardeamiento de la corteza de pitaya amarilla. Además, se evidenció el papel complementario que tienen CAT y POD ante diversas concentraciones celulares de  $H_2O_2$ .

**Palabras clave:** Catalasa, peroxidasa, polifenoloxidasas, características cinéticas, frutas, pitaya amarilla, *Acanthocereus pitajaya*.

#### ABSTRACT

Catalase (CAT), peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO) were extracted from the peel of pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) and were partially characterized. CAT had maximum activities at pH between 6.8 and 7.5 and at temperatures in the range 30 to 50 °C, its  $K_M$  value is 442 mM for  $H_2O_2$ . The pH for maximum activity of POD was from 5.0 to 5.5 and its temperatures between 20 and 25 °C; POD had a  $K_M$  values of 10.6 mM and 5.1 for guaiacol and  $H_2O_2$ , respectively. PPO exhibited its maximum activity at pH 7.0 and at temperatures between 30 and 40 °C; PPO had a  $K_M$  value of 5.5 mM for L-DOPA. Our results indicate that both POD and PPO play an important role in the browning of the pitaya amarilla peel; on the other hand, it was

\* Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Correo electrónico: cenarvaezc@unal.edu.co

observed that CAT and POD must have a complementary role in the  $H_2O_2$  degradation in the cells.

**Key words:** Catalase, peroxidase, polyphenoloxidase, kinetic properties, fruits, pitaya amarilla, *Acanthocereus pitajaya*.

## INTRODUCCIÓN

Hoy en día las frutas adquieren importancia no sólo por su aporte en vitaminas y minerales sino también por su vital contribución en antioxidantes y fibra dietaria. Sin embargo, por lo general su tiempo de vida en anaquel es corto, principalmente si se trata de frutas climatéricas. La pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) es una fruta exótica muy apetecida para su consumo en muchas partes del mundo, gracias a su contenido nutricional, sabor y aroma. En su comercialización se ha observado que el pardeamiento, la necrosis y el ablandamiento de su corteza son los principales factores de deterioro.

En la pérdida de la calidad de las frutas juegan un papel importante el balance entre las especies reactivas de oxígeno (EROS) y el sistema antioxidante (1-3); dentro de las EROS se ubican los radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), los radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Aunque la producción de EROS es un proceso normal, ésta puede verse incrementada no sólo durante la maduración y senescencia de los tejidos, sino también por agentes causantes de estrés como por ejemplo metales pesados, radiación, modificación de la atmósfera, temperaturas extremas y por el ataque de microorganismos (1,2,4).

Dentro de las EROS el  $H_2O_2$  juega un papel importante ya que tiene ciertas funciones vitales en células vegetales, como son su participación en la síntesis de la pared celular y en la respuesta hipersensible ante el ataque de microorganismos (4, 5); sin embargo, sus niveles deben ser controlados por cuanto puede originar los  $\cdot OH$  que son los principales agentes oxidantes de las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (2). En el control del  $H_2O_2$  participan enzimas como la catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) que lo degrada hasta agua y oxígeno, y la guayacol peroxidasa (POD, EC 1.11.1.7) que necesita de un compuesto de carácter fenólico como donador de protones para generar la respectiva quinona (2,6).

Si bien la producción de EROS es una causa importante del deterioro de los vegetales, el pardeamiento enzimático también lo es. La POD, además de hacer parte del sistema antioxidante, ha sido vinculada, junto con la polifenoloxidasa (PFO), con el pardeamiento enzimático de los tejidos (7-14).

La PFO cataliza dos reacciones diferentes en presencia de  $O_2$ : la o-hidroxilación de sustratos fenólicos (actividad cresolasa, EC 1.14.18.1) a o-difenoles, y la oxidación de o-difenoles a quinonas (actividad catecolasa, EC 1.10.3.2); estas quinonas pueden polimerizar espontáneamente a través de rutas no enzimáticas generando pigmentos pardos conocidos como melaninas (12). Esta enzima se ha vinculado con el control de los niveles de  $O_2$  en el fotosistema II y con la respuesta hipersensible ante el ataque de microorganismos (12,15).

En este trabajo se evalúan, en extractos crudos, algunas propiedades cinéticas de dos enzimas clave (CAT y POD) en el control de la concentración celular del  $H_2O_2$  y de PFO, vinculada al pardeamiento y el control de  $O_2$ , extraídas de la corteza de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*), para en posteriores ensayos de almacenamiento poder evaluar la actividad de estas enzimas de una manera adecuada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** Los frutos de pitaya amarilla fueron adquiridos en los principales mercados de Bogotá. Para la extracción de las enzimas y su posterior caracterización cinética parcial se seleccionaron frutos sensorialmente maduros (100% amarillo en la corteza), completamente sanos.

**Extracción de las enzimas.** Las enzimas fueron extraídas de la corteza de los frutos con base en la técnica descrita en un trabajo previo, excepto que la concentración del buffer se cambió a 200 mM (10). Para la medida de la actividad fue necesario preparar polvos de acetona, lo cual se logró al homogenizar la corteza con acetona a  $-8\text{ }^\circ\text{C}$  (relación 1:5, corteza:acetona); se filtró al vacío y el retenido (polvos de acetona) fue lavado con acetona a  $-8\text{ }^\circ\text{C}$  hasta que ésta salió incolora. El sedimento de color blanco fue resuspendido en buffer fosfatos 200 mM, pH 6,8 (relación 1:5, corteza:buffer) y sometido a agitación continua por 24 horas a  $2\text{ }^\circ\text{C}$ . Luego, la suspensión fue centrifugada a  $12.000 \times g$  durante 30 min a  $2\text{ }^\circ\text{C}$ ; el sedimento se desechó y el sobrenadante fue utilizado para las medidas de proteína y de actividad enzimática. Las medidas

siempre se efectuaron con extractos frescos puesto que la actividad puede verse afectada durante el almacenamiento refrigerado o congelado del extracto.

**Cuantificación de proteína.** Se empleó el método de Bradford modificado por Zor y Sellinger (16), por lectura de absorbancia a 450 y 590 nm con BSA como estándar.

**Medida de actividad de CAT.** Para la medida de actividad de CAT se empleó el método permanganométrico (17). La mezcla de reacción consistió en  $100\text{ }\mu\text{L}$  de extracto enzimático más  $900\text{ }\mu\text{L}$   $H_2O_2$  a ciertas concentraciones. Luego de 5 min se adicionaron  $250\text{ }\mu\text{L}$  de  $H_2SO_4$  (1:3). Al final, se tituló el  $H_2O_2$  no descompuesto con  $KMnO_4$  estandarizado (10 mM). Para el blanco el  $H_2SO_4$  fue incorporado antes de adicionar el extracto enzimático. La unidad de actividad (UCAT) fue definida como los  $\mu\text{mol}$   $H_2O_2$  descompuesto/min.

**Medida de actividad de POD.** La actividad POD fue estimada por la medida espectrofotométrica del incremento de la absorbancia a 470 nm (8) en un equipo Genesys 5 uv-vis cada 5 s durante 120 s, con el uso de  $H_2O_2$  como sustrato y guayacol como donador de protones. La celda de medida contenía  $200\text{ }\mu\text{L}$  de extracto enzimático y  $1800\text{ }\mu\text{L}$  de guayacol/ $H_2O_2$  a determinadas concentraciones. El blanco difería en que el extracto enzimático fue hervido previamente en un baño María a  $92\text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 min. La unidad de actividad (UPOD) fue definida como el cambio en una unidad de absorbancia por min (obtenida al evaluar la pendiente de la gráfica de absorbancia contra tiempo) (8).

**Medida de actividad de PFO.** Para medir la actividad de PFO se efectuó lec-

tura de absorbancia a 475 nm (12) en un espectrofotómetro Genesys 5 uv-vis cada 5 s durante 120 s. Se adicionaron 1000  $\mu$ L de extracto enzimático sobre 1000  $\mu$ L de L-DOPA de ciertas concentraciones. El blanco fue preparado en forma igual que en POD. La unidad de actividad (UPFO) fue definida como el cambio en una unidad de absorbancia por min (12).

Para las tres enzimas en estudio las unidades de actividad fueron referidas a mL extracto enzimático o a mg de proteína. Las medidas de actividad de CAT, POD y PFO fueron efectuadas mínimo por duplicado a diferentes valores de pH y temperatura; también se evaluó el efecto de diversas concentraciones de  $H_2O_2$  sobre la actividad de CAT, de guayacol/ $H_2O_2$  sobre la actividad de POD y de L-DOPA sobre la actividad de PFO. Sobre los resultados se efectuaron los ANOVA de acuerdo con el modelo escogido.

### Caracterización de CAT, POD y PFO

a) **Efecto del pH.** Las medidas de actividad de CAT se realizaron con  $H_2O_2$  100 mM a 37 °C, para POD se empleó guayacol/ $H_2O_2$  40 mM/5mM a 25 °C, y para PFO se usó L-DOPA 14 mM a 37 °C. El pH de medida fue cambiado empleando diferentes soluciones buffer, todas 200 mM: gly-HCl pH 2,0, citratos pH 3,0 a 5,5, fosfatos pH 6,0 a 7,0 y Tris-HCl pH 8,0 a 9,0. Los experimentos siguientes fueron efectuados al pH óptimo para cada enzima.

b) **Efecto de la temperatura.** Las medidas de actividad de CAT se realizaron con  $H_2O_2$  500 mM en buffer fosfatos 200 mM pH 7,0 a temperaturas entre 0 a 60 °C, la medida de actividad de POD se

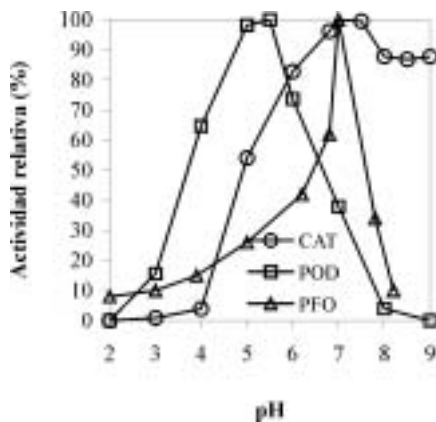
efectuó con guayacol/ $H_2O_2$  40 mM/5 mM en buffer fosfatos 200 mM pH 5,5 a temperaturas entre 0 a 60 °C, y la actividad de PFO se midió con L-DOPA 14 mM en buffer fosfatos 200 mM pH 7,0 a temperaturas entre 20 a 60 °C. Los experimentos siguientes fueron efectuados al pH y temperatura óptimos para cada enzima.

c) **Efecto de la concentración de sustrato.** Para CAT se cambió la concentración de  $H_2O_2$  entre 20 a 500 mM. Para POD se varió la concentración de guayacol entre 1 a 80 mM dejando fija la concentración de  $H_2O_2$  en 5 mM; por otro lado, se varió la concentración de  $H_2O_2$  entre 1 a 500 mM empleando guayacol 40 mM. Para PFO se emplearon soluciones de L-DOPA en concentraciones que oscilaron entre 1 a 14 mM. Para calcular la constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) y la velocidad máxima ( $V_{MÁX}$ ) se recurrió al método de Lineweaver-Burk, en el que se grafica 1/Unidad de actividad contra 1/[sustrato].

### RESULTADOS Y ANÁLISIS

Para los efectos evaluados (pH, temperatura y concentración de sustrato) el ANOVA mostró un efecto altamente significativo. Para las tres enzimas en estudio se encontró que a las condiciones de ensayo las actividades no disminuían durante la incubación (datos no mostrados).

**Efecto del pH.** En la Figura 1 se observa que los valores de pH a los cuales se presenta la máxima actividad están entre 6,8 a 7,5 para CAT, entre 5,0 a 5,5 para POD y en 7,0 para PFO. Para las medidas del efecto de la temperatura se eligió un pH de 7,0 para CAT, de 5,5 para POD y de 7,0 para PFO.



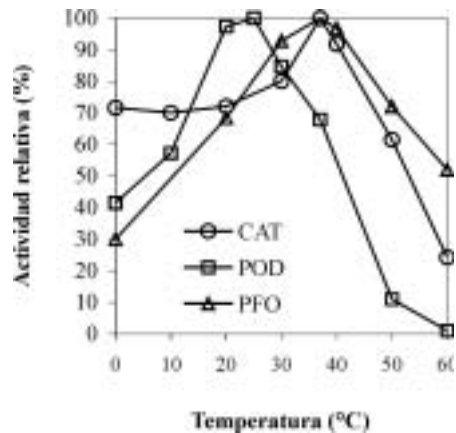
**Figura 1.** Efecto del pH sobre la actividad de catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y polifenoloxidasas (PFO) extraídas de la corteza de frutos de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*). En estos experimentos los máximos de actividad (100%) corresponden en U/mg proteína a 300 para CAT, 11 para POD y 0,25 para PFO.

De las tres enzimas en estudio la CAT es menos tolerante a valores de pH ácidos pero mantiene su actividad –más que POD y PFO–, en los valores básicos. El valor de pH para la actividad máxima de CAT encontrado en este trabajo es igual al reportado para el conjunto pulpa más corteza de uva caimaronera (*Pourouma cecropiifolia*): 7,0 (18). El pH adecuado para POD es inferior al encontrado para POD extraída de repollo (*Brassica oleracea*): 6,4 (7), del conjunto pulpa más corteza de uva caimaronera: 6,0 (9), de la pulpa de uva caimaronera: 6,0 (10), y está en el intervalo de los encontrados para tres isoPOD de arveja (*Pisum sativum*): 5,0, 6,0 y 5,0 (8). Por su parte, el pH en el que se registró la máxima actividad de PFO coincide con el reportado para esta misma enzima extraída del conjunto pulpa más corteza (9) y de la pulpa de uva caimaronera (10), y tanto de corteza como de pulpa de lulo (*Solanum quitoense*) (11), pero es inferior al valor de 8,0 para PFO de dog

rose (*Rosa dumalis*) (13). Teniendo en cuenta que el pH de la corteza (relación 1:1, corteza:agua) oscila entre 5,0 a 5,5 la actividad de POD estaría cercana a la óptima, seguida por CAT y PFO, si bien se debe considerar que la célula no tiene un único valor de pH.

**Efecto de la temperatura.** En la Figura 2 se representa el efecto de la temperatura sobre la actividad de CAT, POD y PFO. La actividad de CAT es alta en un intervalo de temperaturas entre 37 a 40 °C con un máximo en 37 °C; la de POD es alta entre 20 a 25 °C con actividad máxima a 25 °C, y la de PFO es alta entre 30 a 40 °C, con un máximo en su actividad a 37 °C. Los valores de temperatura en los que se obtuvo la máxima actividad fueron usados para la medida del efecto de la concentración del sustrato.

A 60 °C la POD es la que resulta más inhibida (1% de actividad), seguida por



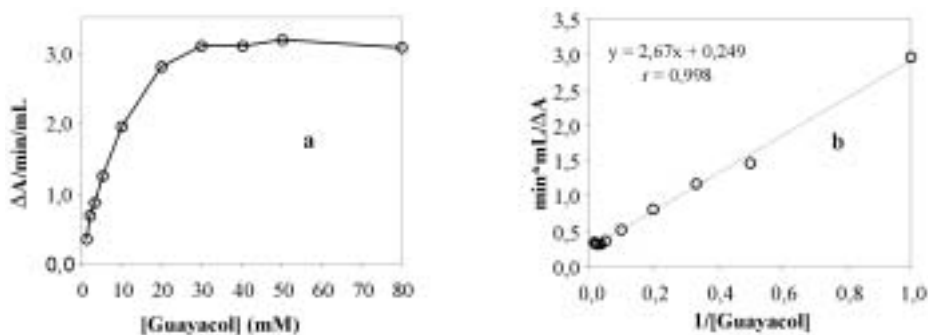
**Figura 2.** Efecto de la temperatura sobre la actividad de catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y polifenoloxidasas (PFO) extraídas de la corteza de frutos de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*). En estos experimentos los máximos de actividad (100%) corresponden en U/mg proteína a 1743 para CAT, 12 para POD y 0,72 para PFO.

la CAT (20% de actividad), siendo la PFO la que presenta mayor actividad a esta temperatura (52% de actividad). Al disminuir la temperatura en 20 °C por debajo de la óptima la CAT es quien resulta con valores superiores de actividad, por lo que de las tres enzimas en estudio la CAT es la menos susceptible a los cambios de temperatura y la POD la más sensible. Algo similar ocurre si la temperatura, en los tres casos, se baja a 0 °C. Para CAT el valor de temperatura de máxima respuesta es igual al encontrado para la extraída del conjunto corteza más pulpa de uva caimaronna (18). La temperatura de máxima actividad para POD es inferior a la reportada para POD extraída de repollo: 45 °C (7), de uva caimaronna (corteza más pulpa), en la que la actividad enzimática es óptima entre 30 a 40 °C (detectable incluso a 80 °C) (9) y de pulpa de uva caimaronna: 37 °C (10). El valor de temperatura al que PFO alcanza su actividad máxima es inferior al reportado para esta misma enzima de pulpa de uva caimaronna: 45 °C (10) y de frutos de dog rose: 45

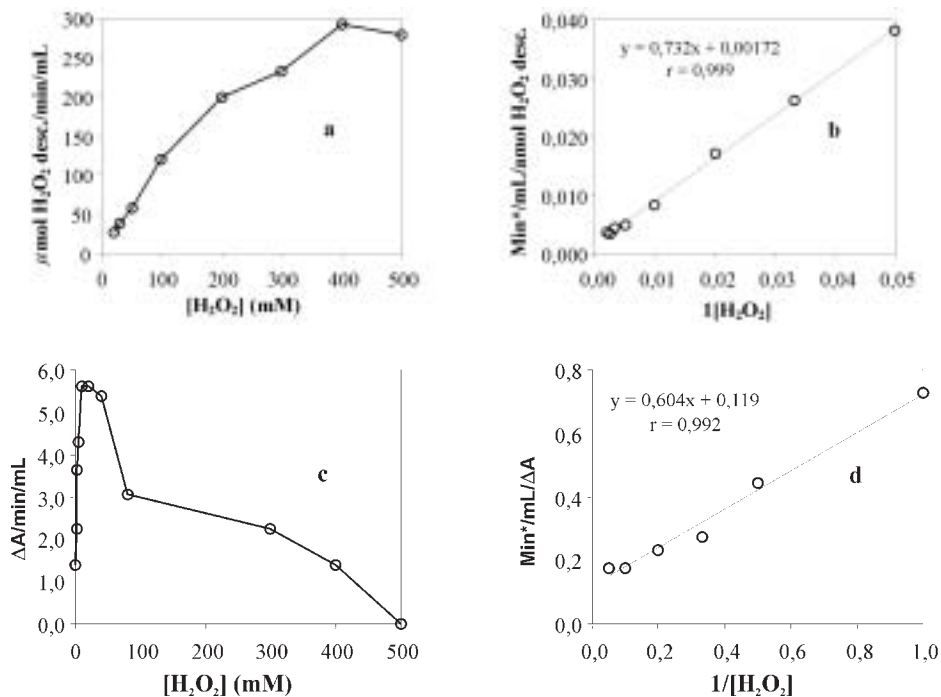
°C (13), pero está en el intervalo del encontrado para la extraída de uva caimaronna (corteza más pulpa): 30 a 40 °C (9). Para PFO extraída de corteza y pulpa de lulo se reporta que su actividad no cambia de manera apreciable en un intervalo de temperaturas de 20 a 80 °C (11).

**Efecto de la concentración de sustrato.** Cuando se evalúa el efecto de la concentración de guayacol sobre la actividad de POD (Figura 3a) se obtiene una saturación en 30 mM y la actividad se mantiene prácticamente invariable hasta 80 mM, máxima concentración evaluada.

Al evaluar el efecto de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la actividad de CAT y POD (Figura 4a y 4c) se observa que la actividad de POD crece conforme la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se incrementa y se hace máxima en 10 mM; a 40 mM la actividad empieza a verse inhibida en tanto que a esta concentración la actividad de CAT tiene un comportamiento creciente;



**Figura 3.** Efecto de la concentración de guayacol sobre la actividad de peroxidasa extraída de la corteza de frutos de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*). Representación de (a) Michaelis-Menten y de (b) Lineweaver-Burk.



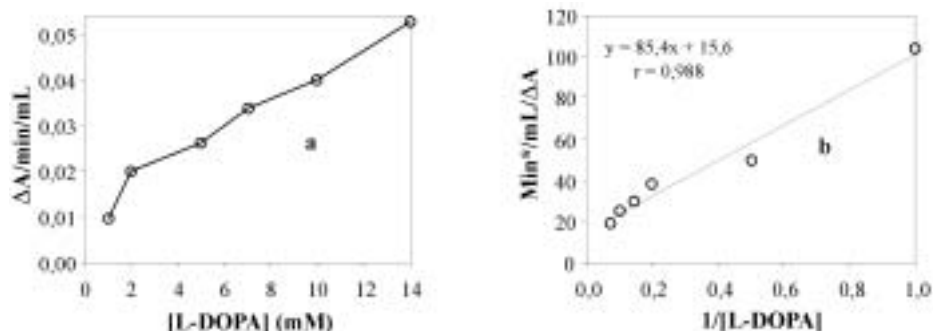
**Figura 4.** Efecto de la concentración de  $H_2O_2$  sobre la actividad de (a y b) catalasa y (c y d) peroxidasa extraídas de la corteza de frutos de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*). Representación de Michaelis-Menten (a y c) y de Lineweaver-Burk (b y d).

más aún, a 500 mM CAT aún no se ve inhibida y POD lo está completamente.

Una vez evaluado el efecto del  $H_2O_2$  sobre la actividad de CAT y de guayacol/ $H_2O_2$  sobre POD se investigó el efecto de L-DOPA sobre la actividad de PFO. En este caso, se encontró que PFO exhibió una actividad siempre creciente al aumentar la concentración del sustrato (Figura 5a). Para esta enzima no se logró evidenciar experimentalmente la concentración de saturación por cuanto en las condiciones de ensayo no fue posible obtener soluciones de L-DOPA con concentraciones superiores a 14 mM.

Con los valores de actividad enzimática de CAT, POD y PFO en función de la

concentración de sustrato se constituyeron gráficas de acuerdo con el modelo de Lineweaver-Burk y se calcularon los valores aparentes de  $K_M$  y  $V_{MÁX}$  (Figuras 3b, 4b, 4d y 5b). Al evaluar el efecto de la concentración de guayacol sobre la actividad de POD se encontró un valor de  $K_M$  de 10,6 mM. Para evaluar el efecto de la concentración del  $H_2O_2$  sobre la actividad de POD se tuvieron en cuenta los valores de actividad hasta 20 mM de  $H_2O_2$  debido a la inhibición observada a concentraciones superiores; en este caso el valor de  $K_M$  para  $H_2O_2$  fue de 5,1 mM. De otro lado, para CAT se encontró un valor de  $K_M$  de 442 mM. Al evaluar el efecto de la concentración de L-DOPA sobre la actividad de PFO se encontró un valor de



**Figura 5.** Efecto de la concentración de L-DOPA sobre la actividad de polifenoloxidas extraída de la corteza de frutos de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*). Representación de (a) Michaelis-Menten y de (b) Lineweaver-Burk.

$K_M$  de 5,5 mM. De acuerdo con el modelo de Lineweaver-Burk los valores de  $V_{MÁX}$  para CAT, POD y PFO son respectivamente (en U/mL) 581 para  $H_2O_2$ , 8,4/4,0 para  $H_2O_2$ /guayacol y 0,064 para L-DOPA. Si estas velocidades se evalúan de manera visual a través de la representación de Michaelis-Menten se obtienen para POD  $V_{MÁX}$  de 5,6/3,2 para  $H_2O_2$ /guayacol, en tanto que para CAT y PFO este método es poco efectivo por cuanto no se visualiza claramente el máximo de velocidad. Al emplear este segundo método para evaluar  $K_M$  se obtendría para POD 2,5/7,5 para  $H_2O_2$ /guayacol. En general, en la literatura se encuentran valores de  $K_M$  y  $V_{MÁX}$  hallados de acuerdo con el método de Lineweaver-Burk, si bien en ciertos casos reportan los hallados por los dos métodos con resultados dispares (19).

Aunque la POD aquí estudiada manifiesta alta tolerancia al guayacol, existen reportes en los que se muestra que el guayacol puede llegar a inhibir esta enzima. Así, para una iso-POD de arveja se indica que su actividad se inhibe a concentraciones de guayacol superiores a 24 mM y para otras dos iso-POD la inhibición se da

a valores mayores a 40 mM (8). De otro lado, el efecto inhibitor de  $H_2O_2$  sobre la actividad de POD encontrado en este trabajo ha sido descrito en otros reportes y puede estar relacionado con el efecto oxidante de este compuesto sobre algunos aminoácidos del sitio activo (8,10).

La POD presenta una afinidad por guayacol similar a las POD extraídas de arveja verde ( $K_M = 10,2$ ; 10,2 y 10,8 mM, para tres isoenzimas) (8) y del fruto entero sin semilla de uva caimaron (  $K_M = 10,0$  mM) (9); la afinidad por guayacol de la POD extraída en este trabajo es inferior a la de pulpa de uva caimaron (  $K_M = 2,0$  mM) (10) y superior a la reportada para la extraída de pera (*Pyrus bretschneideri*) ( $K_M = 45,0$  mM) (14). El valor encontrado de  $K_M$  para  $H_2O_2$  muestra que la POD tiene mayor afinidad que para una isoPOD extraída de arveja verde ( $K_M = 7,2$  mM) (8), pero menor afinidad que para una isoenzima extraída de arveja verde ( $K_M = 2,6$  Y 4,3 mM) (8), de uva caimaron (pulpa más corteza) ( $K_M = 0,17$  mM) (9), de la pulpa de uva caimaron ( $K_M = 0,72$  mM) (10) y de pera ( $K_M = 1,5$  mM) (14).



La respuesta observada de POD y CAT frente a la concentración de  $H_2O_2$  pone en evidencia una complementariedad entre estas dos enzimas: teniendo en cuenta que la concentración de  $H_2O_2$  en la célula puede variar en un amplio intervalo (desde cantidades del orden nM hasta 500 mM) (2), la POD sería muy efectiva a bajas concentraciones de peróxido (bajos niveles de estrés), en tanto que la CAT tendría una baja participación dada su baja afinidad por este sustrato; en complemento, a altas concentraciones de  $H_2O_2$  (altos niveles de estrés) la CAT entraría a tomar un papel importante en la degradación de este compuesto. En este punto podría surgir la idea de comparar los valores de velocidad máxima entre CAT y POD pero se debe considerar que las unidades de actividad fueron definidas de manera diferente; al tratar de convertir el incremento de absorbancia del producto de reacción tras la catálisis de POD en  $H_2O_2$  descompuesto, y tener la actividad de ambas enzimas como consumo de peróxido, se debe tener presente la dificultad en establecer el patrón estequiométrico para POD (8,20). En general, las CAT tienen bajas afinidades por el  $H_2O_2$  si se compara con las afinidades que suelen tener las POD por este mismo compuesto, lo que significa que las CAT toleran altas concentraciones de peróxido; así por ejemplo, para las CAT extraídas de diversos microorganismos se reportan valores de  $K_M$  que oscilan entre 64 y 537 mM (19).

El valor de  $K_M$  encontrado para PFO indica menor afinidad que para la de uva caimaron (pulpa más corteza) ( $K_M = 2,70$  mM) (9), pulpa de uva caimaron ( $K_M = 0,42$  mM) (10) y de dog rose ( $K_M = 0,606$  mM) (13), pero mayor afinidad por L-DOPA al reportado para PFO ex-

traída de pera ( $K_M = 8,9$  mM) (14). Teniendo en cuenta que el  $O_2$  puede dar origen a las EROS (2), el control de sus niveles puede atenuar la producción de estas especies; desde este punto de vista la PFO tendría una función de control de EROS. De otro lado, las afinidades encontradas para PFO y POD por sustratos de carácter fenólico (L-DOPA y guayacol, respectivamente) sugieren que estas enzimas poseen la potencialidad de generar pardeamiento ante diversas condiciones de estrés.

En conclusión, las enzimas CAT, POD y PFO extraídas de la corteza de frutos de pitaya amarilla coinciden en sus valores de pH óptimo, temperatura óptima y afinidad por los sustratos en el intervalo de los reportados en otros trabajos. La diferencia en los parámetros cinéticos frente a  $H_2O_2$  hallados para CAT y POD indica que estas enzimas tienen un papel complementario en cuanto a la degradación de este compuesto potencialmente tóxico para las células. Además, las características halladas para POD y PFO indican que estas enzimas pueden participar activamente en los procesos de pardeamiento característicos de la corteza de este fruto.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hegedüs, A.; Erdei, S.; Hováth, G. (2001). Comparative studies of  $H_2O_2$  detoxifying enzymes in green and greening barley seedling under cadmium stress. *Plant. Sci.* 160, 1085-1093.
2. Hansberg, T. W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje bioquímico* 26, 19-54.

3. Jiménez, A.; Gómez, J. M.; Navarro, E.; Sevilla, F. (2002). Changes in the antioxidative system in mitochondria during ripening of pepper fruits. *Plant. Physiol. Biochem.* **40**, 515-520.
4. Henzler, T.; Steudde, E. (2000). Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across water channels. *J. Exp. Bot.* **51**, 2053-2066.
5. Raskin, I. (1992). Role of salicylic acid in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol.* **43**, 439-463.
6. Stryer, L. (1995). *Biochemistry*. New York: N. H. Freeman and Company.
7. Fujita, S.; bin-Saari, N.; Maegawa, M.; Tetsuka, T.; Hayashi, N.; Tono, T. (1995). Purification and properties of polyphenoloxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.). *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1138-1142.
8. Halpin, B.; Pressey, R.; Jen, J.; Mondy, N. (1989). Purification and characterization of peroxidase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*). *J. Food Sci.* **54**, 644-649.
9. Narváez, C. C. E.; Restrepo, P. (2002). Efecto del almacenamiento de la uva caimaroná (*Pourouma cecropiifolia*) a diferentes temperaturas sobre la actividad de polifenoloxidasas y peroxidasa. *Rev. Col. Quím.* **31**, 131-144.
10. Rivera, C. A. P.; Restrepo, P.; Narváez, C. C. E. (2004). Polifenoloxidasas y peroxidasa de pulpa de uva caimaroná (*Pourouma cecropiifolia*). *Rev. Col. Quím.* **33**, 57-66.
11. Rubio, M. E. Estudio del cambio de actividad de polifenoloxidasas, PFO, durante el proceso de maduración del lulo (*Solanum quitoense* L.). Tesis de Maestría. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, 1999.
12. Sánchez-Ferrer, A.; Rodríguez-López, J. N.; García-Cánovas, F.; García-Carmona, F. (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochem. Biophys. Acta* **1247**, 1-11.
13. Sakiroglu, H.; Kúfrevioglu, Ö. I.; Kocacaliskan, I.; Oktay, M.; Onganer, Y. (1996). Purification and characterization of dog-rose (*Rosa dumalis* Reicht.) polyphenoloxidase. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2982-2986.
14. Zhou, H.; Feng, X. (1991). Polyphenoloxidase from yali pear (*Pyrus bretschneideri*). *J. Sci. Food Agric.* **57**, 307-313.
15. Lazarovits, G.; Wasrd, E. W. B. (1982). Polyphenoloxidase activity in soybean hypocotyls at sites inoculated with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Physiological Plant Pathology* **21**, 227-236.
16. Zor, T.; Selinger, Z. (1996). Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.* **236**, 302-308.

17. Ulrich, B. H. (1974). *Meth. Enz. Anal.* New York: Academic Press, Inc.
18. Narváez, C. C. E. Evaluación del comportamiento fisiológico del fruto de uva caimaroná (*Pourouma cecropiifolia*) a temperatura ambiente y a temperaturas de refrigeración. Tesis de Maestría. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, 2002.
19. Switala, J.; Loewen, P. C. (2002). Diversity of properties among catalases. *Arch. Biochem. Biophys.* **401**, 145-154.