

Laboratorio de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de Murcia

Inhibidores estructurales de fenolasa de albaricoque

por

A. Soler-Martínez, F. Sabater-García y J. A. Lozano (*)

(Recibido para publicar el 20 de octubre de 1965)

El enzima o sistema enzimático capaz de producir la hidroxilación u oxidación de mono y difenoles respectivamente, ha mostrado ser sensible a una gran variedad de sustancias entre las que se incluyen varios aniones y cationes inorgánicos y diversos compuestos orgánicos. De entre ellas, los ácidos orgánicos han sido objeto de bastantes estudios. LUDWIG y NELSON (4) y GREGG y NELSON (1) observaron el efecto inhibitor del ácido benzoico; posteriormente, KUTTNER y WAGREICH (3) compararon los efectos de una serie de ácidos, alcoholes, polifenoles sustituidos, ésteres, aldehidos y cetonas, resaltando la acción de los ácidos carboxílicos, especialmente los aromáticos y concluyen afirmando que el ácido benzoico es el mejor inhibidor.

Finalmente, KRUEGER (2) llegó a conclusiones parecidas y sugirió que debe existir un grupo imidazol en el lugar donde tiene efecto la inhibición en la molécula del enzima.

Los trabajos citados se han realizado utilizando tirosinasa de champiñón; nos-

otros hemos observado que el enzima o-difenol: O₂ oxidoreductasa de albaricoque posee propiedades no coincidentes con las del enzima de champiñón, por lo que decidimos estudiar más a fondo la acción inhibitor de los ácidos carboxílicos.

Los resultados obtenidos difieren sustancialmente de los hallados en los trabajos precedentes.

Material y métodos

ENZIMA. — Las disoluciones de enzima se prepararon en cámara fría por trituración en mortero de 1,0 g de polvo acetónico seco de albaricoque con tampón fosfato monosódico-fosfato disódico 0,1 M, pH 7 hasta un volumen total de 100 ml.

El extracto se centrifuga a 8.000 × g durante 15 minutos a 0° C y el sobrenadante se utiliza como material activo.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA. — En un volumen total de 8 ml se colocan 100 µmoles de catecol, 15 µmoles de ácido ascórbico, 500 µmoles (como aniones) de tampón fosfato disódico-ácido cítrico de pH 5,0 y 1 ml de disolución enzimática.

(*) Con una beca de la Comisaría de Protección Escolar.

Se deja actuar a 25° C mientras se agita con aparato magnético a una velocidad tal, determinada experimentalmente, que el oxígeno no limita la velocidad de la reacción, la cual se interrumpe a los 3 minutos por la adición de 5 ml de ácido metafosfórico del 10 % (peso/volumen) y a continuación se valora el ácido ascórbico residual con disolución 0,005 N de iodo. Se realiza un blanco con enzima previamente hervido y la diferencia de valoraciones nos señala la actividad del enzima, cuyas unidades se expresan en μ moles de sustrato (catecol) oxidados en 1 minuto en la mezcla de reacción antes descrita.

El método da resultados reproducibles y lineales con la cantidad de enzima, siempre que esta última cantidad no exceda de 3,5 unidades. En varias ocasiones se han empleado también técnicas manométricas de medidas de actividad y los resultados han coincidido con los obtenidos con el procedimiento volumétrico.

En los ensayos efectuados en presencia de inhibidor, éste se añade en una cantidad tal que queda 10^{-2} M en el medio de reacción. En los casos en que por su insolubilidad ello no es posible, se

trabaja a saturación de inhibidor en el medio.

Resultados y discusión

En unos primeros ensayos de inhibición con diversos ácidos carboxílicos se observaron grandes diferencias cuantitativas en sus respectivas inhibiciones, por lo que se consideró necesario la utilización de otros ácidos de este tipo para hacer patentes esas diferencias. En la tabla I se exponen los resultados de un ensayo general con 21 ácidos.

De los datos de esta tabla deducimos varias consecuencias:

1. — En la serie alifática no se encuentra inhibición considerable, sobre todo teniendo en cuenta la alta concentración de inhibidor usada en los ensayos. Este resultado es diferente al obtenido por KRUEGER con tirosinasa de champiñón.

En nuestro caso, sólo aparece inhibición, con valores bajos, con ácidos mono y dicarboxílicos de cadena larga (7 carbonos).

2. — Los distintos grupos funcionales introducidos en las cadenas no provocan la aparición de inhibición.

3. — En la serie aromática, por el

TABLA I

Inhibición de fenolasa de albaricoque por algunos ácidos

Sustancia	% inhibición	Sustancia	% inhibición
ác. acético	0	ác. láctico	0
ác. enántico	22	ác. málico	0
ác. oxálico	3	ác. tartárico	0
ác. succínico	0	ác. dihidroximaleico	0
ác. pimélico	13	ác. pirúvico	0
ác. fumárico	0	ác. α -cetobutírico	0
ác. crotónico	0	ác. oxalacético	0
ác. monocloroacético	0	ác. benzolco	67
ác. tricloroacético	0	ác. p-aminobenzolco	70
glicina	0	ác. o-hidroxibenzolco	70
ác. glutámico	0		

contrario, los valores de inhibición son extraordinariamente elevados, del orden del 70 %, en relación con la serie alifática.

Estos resultados podrían hacer dudar de que la inhibición sea un efecto específico del grupo carboxilo, pero los ensayos realizados con derivados del carboxilo y con otros grupos carbonílicos, aun siendo aromáticos, tal como se muestra en la tabla II, señalan la necesidad del grupo carboxilo libre para que exista una inhibición considerable.

TABLA II

Inhibición de fenolasa de albaricoque por grupos aromáticos relacionados con el carboxilo.

Sustancia	% inhibición
ác. benzoico	67
benzaldehído	3
acetofenona	13
benzoato de etilo	5
p-hidroxibenzoato de metilo	13
p-hidroxibenzoato de etilo	7
p-hidroxibenzoato de propilo	12
p-aminobenzoato de etilo	9
p-nitrocinamato de etilo	6
salol	5
aldehído salicílico	12
m-amino p-oxibenzoato de etilo	0

Por tanto, hasta ahora se podrían considerar imprescindibles el grupo carboxilo y el núcleo aromático. Si este último actúa como tal, o sea, debido a la movilidad de los electrones de su sistema conjugado, el poder inhibidor quedará claramente afectado por la presencia en el núcleo de sustituyentes que cedan o que tomen electrones. Por ello, ensayamos ácidos benzoicos monosustituídos en distintas posiciones por los dos tipos de sustituyentes, con los resultados expuestos en la tabla III.

Para poder juzgar adecuadamente estos resultados, se ha de tener presente

TABLA III

Inhibición de fenolasa de albaricoque por ácidos benzoicos monosustituídos.

Sustituyente	% inhibición
AMINO	67
orto	37
meta.	24
para	70
HIDROXI	70
orto	58
meta.	62
para	0
METOXI	78
orto	75
meta.	16
para	76
METIL	86
orto	40
meta.	82
para	75
COLORO	0
orto	38
meta.	75
para	5
NITRO	27
orto	21
meta.	
para	
CARBOXI	
orto	
meta.	
para	

que son muy diversos los efectos que cada grupo sustituyente puede ejercer. De entre ellos, quizás los más importantes son:

1. — Efectos electrónicos sobre el núcleo.
2. — Efectos estéricos.
3. — Efectos sobre el pK del carboxilo.
4. — Efectos polares debidos a la posible carga del grupo ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$).
5. — Capacidad del conjunto para actuar como molécula complejante.

Debido a ello, sería muy difícil hacer un análisis detallado de los valores de inhibición de la tabla III, por lo que es de más utilidad entresacar las dos consecuencias más importantes e inmediatas:

1. — La existencia de un fuerte efecto estérico que se pone claramente de mani-

fiesto en el caso de sustituyentes en *orto* y que en *para* suele ser despreciable (excepto cuando son grupos muy voluminosos). Esta deducción la refuerzan otros valores de inhibición tales como los que se indican en la tabla IV. Los grupos $-\text{OH}$ y $-\text{NH}_2$ en posición *orto* se apartan de esta norma de conducta, al igual que les ocurre con otras propiedades aparecidas en el estudio de sustratos, etc. Por ello, se deben considerar como casos anormales, quizás debido a una acción complejante. Por otra parte puede observarse que al acetilar o al metilar el $-\text{OH}$ en *orto*, desaparece su acción inhibidora.

TABLA IV

Inhibición de fenolasa de albaricoque; efectos estéricos.

Sustancia	% inhibición
ác. benzoico	67
ác. $\text{o-CH}_3\text{-COO-benzoico}$. . .	15
ác. $\text{o-CH}_3\text{-CO-benzoico}$. . .	13
ác. $\text{m-SO}_3\text{H-benzoico}$	0
ác. $\text{p-tertbutilbenzoico}$	11
ác. p-fenilbenzoico	0
ác. $\text{p-(o-COOH)fenilbenzoico}$.	0

2. — La tabla III muestra los resultados de introducir en el núcleo bencénico sustituyentes de tipo negativo (Cl , NO_2 y COOH) o de tipo positivo (NH_2 , OH , OCH_3 y CH_3) en cada una de las tres posiciones posibles y no se observa una norma que diferencie un grupo del otro, aun juzgando por los isómeros *para*, en que los efectos estéricos serán menores, por lo que se debe pensar que el efecto inhibidor no es debido a un estado electrónico especial del núcleo.

Esta consecuencia obliga a ensayar otros núcleos, aromáticos o no, con los resultados expresados en la tabla V, donde el único ácido que presenta inhibición comparable a la del ácido benzoico es el ácido β -naftoico, mientras

TABLA V

Inhibición de fenolasa de albaricoque por ácidos de núcleos no bencénicos.

Sustancia	% inhibición
ác. benzoico	37
ác. ciclohexancarboxílico . . .	13
ác. α -naftoico	6
ác. β -naftoico	67
ác. picolínico	8
ác. nicotínico	23
ác. isonicotínico	22
ác. quinoleínico	0
ác. furoico	7

que el α -naftoico no inhibe, debido, sin duda, al gran efecto estérico en *orto*.

Hemos de deducir que el efecto inhibidor es específico de alguna característica del núcleo bencénico, junto con el carboxilo, por lo que interesa saber si necesariamente este grupo carboxilo ha de estar unido directamente al núcleo, aspecto que queda aclarado con los resultados de la tabla VI. En ella, la gran inhibición ocasionada por el ácido cinámico y los bajos valores de los otros derivados del ácido benzoico, indican que no es necesario que el carboxilo vaya unido directamente al núcleo, pero que si se rompe el sistema conjugado desaparece la inhibición.

No puede pensarse que el efecto inhibidor sea debido simplemente a la estructura $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$, pues ya se vió

TABLA VI

Inhibición de fenolasa de albaricoque. Efecto de la separación del carboxilo del núcleo.

Sustancia	% inhibición
ác. benzoico	67
ác. fenilacético	0
ác. fenilpropiónico	8
ác. fenoxiacético	12
ác. cinámico	90
ác. amigdalico	0

antes que los ácidos crotonico, fumárico y dihidroximaleico no inhibían. Resultó un ensayo muy demostrativo el del ácido sórbico, que es un caso más avanzado de insaturación sin núcleo bencénico y que produjo una inhibición del 67 %, o sea, igual a la del ácido benzoico. La gran diferencia de poder inhibidor entre el ácido crotonico (0 %) y el ácido sórbico (67 %) indica una necesidad absoluta del segundo doble enlace.

Como causa del poder inhibidor anteriormente se ha prescindido de la movilidad de electrones, característica de los sistemas conjugados, lo que induce a creer que sea más bien un problema de distribución espacial de la cadena unida al grupo carboxilo.

La característica común a todas las sustancias que muestran un efecto inhibidor elevado es una disposición estructural tal que el carboxilo queda unido a una cadena de, al menos, 4 carbonos, formando un sistema resonante y, por tanto, situados en un plano tal como se observa en la figura 1. Tal estructura es la que consideramos responsable de las inhibiciones que hemos venido tratando.

Según esta hipótesis, un ácido de cadena abierta tal como el mucónico, sería estructuralmente comparable al ácido tereftálico y efectivamente sus acciones respectivas provocan inhibiciones del 8 y del 10 % respectivamente.

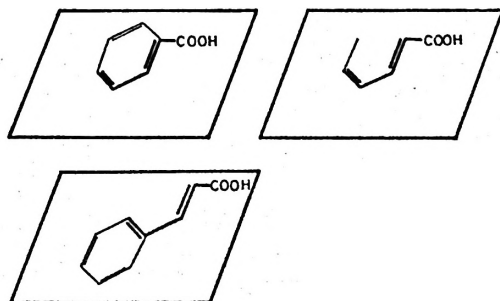


FIG. 1. — Estructuras espaciales que producen inhibición con fenolasa de albaricoque.

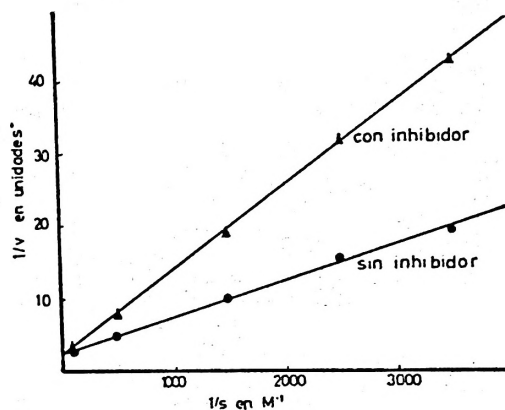


FIG. 2. — Inhibición competitiva de fenolasa de albaricoque por ácido benzoico.

Las inhibiciones consideradas son de tipo competitivo, como demuestra la figura 2. En cuanto a su mecanismo de acción, es interesante observar que de todos los inhibidores estudiados el más poderoso es el ácido cinámico y, por otra parte, de entre unos 20 sustratos naturales y sintéticos utilizados, el de mayor *eficiencia*, para medir la cual usamos el cociente $V_m/2K_m$, es el ácido cafeico, o sea, el mismo ácido cinámico con estructura difenol, por lo que parece ser que el lugar de inhibición no es exactamente el centro activo, pero está muy próximo a él, de tal modo que en el caso del ácido cafeico la formación del complejo enzima-sustrato viene facilitada en los dos centros, el de inhibición y el de acción enzimática.

Resumen

El enzima o-difenol : O_2 oxidoreductasa de albaricoque se inhibe fuertemente por ácidos carboxílicos aromáticos; es imprescindible el grupo carboxilo libre, que ha de estar unido directamente al núcleo bencénico o conjugado con él. El mismo efecto se observa si el núcleo bencénico se sustituye por una cadena abierta con, al menos, dos enlaces etilénicos conjugados entre sí y con el grupo carboxilo. Se propone una estructura espacial responsable del efecto inhibidor.

Summary

Structural inhibitors of apricot fenolase

Aromatic carboxylic acids strongly inhibit o-diphenol: O₂ oxydoreductase from apricot. The effect is subjected to steric hindrance. While the free carboxyl group proved to be absolutely required, the benzene ring can be replaced by an open chain provided it has at least two ethylenic bonds conjugated between them and with the carboxyl group. On the basis of the substances tested as inhi-

bitors, an spatial requirement is postulated as responsible for the inhibitory effect.

Bibliografía

- (1) GREGG, D. C. and NELSON, J. M. : *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 2506, 1940.
- (2) KRUEGER, R. C. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **57**, 52, 1955.
- (3) KUTTNER, R. and WAGREICH, H. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **43**, 80, 1953.
- (4) LUDWIG, B. J. and NELSON, J. M. : *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 2601, 1939.