

## ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE POLIFENOLOXIDASE E PEROXIDASE EM POLPA DE ABACATES

Isabela Maria Reck (UEM) E-mail: isabelareck@hotmail.com  
Lígia Gomes Melchior (UEM) E-mail: igimelchior@hotmail.com

**Resumo** - O abacate é um fruto tropical que traz muitos benefícios a saúde. No entanto, ele é pouco utilizado na indústria de alimentos, uma vez que sua preservação é comprometida pelo escurecimento enzimático de sua polpa, um problema indesejável que altera a coloração e sabor. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar as características bioquímicas de variedades de abacate cultivadas no estado do Paraná, com expectativa de obter resultados importantes para o beneficiamento da polpa deste fruto para a indústria. Frutos de três variedades de abacate foram colhidos em estágio de maturação verde e madura. Foram realizadas avaliações da atividade enzimática da polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD), assim como isolamento. A partir dos resultados, observou-se que os cultivares de abacates avaliados, Beatriz, Choquete e Ouro Verde, demonstraram atividade de PPO e POD diferentes. O Choquete é o que apresentou menor atividade enzimática, sendo, portanto, o mais recomendado para a agroindústria.

**Palavras-chave:** polpa de abacate, enzimas oxidativas, polifenoloxidase, peroxidase.

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF POLYPHENOLOXIDASE AND PEROXIDASE IN AVOCADO PULP

**Abstract:** The avocado is a tropical fruit that has many health benefits. However, it is rarely used in the food industry, since its preservation is compromised by enzymatic browning of the pulp, an undesirable problem that changes the color and flavor. The objective was to study the biochemical characteristics of avocado varieties grown in the state of Paraná, expecting to get significant results for the processing of the pulp of this fruit to the industry. Fruits of three avocado varieties were harvested in green and in mature stage of ripening. Evaluations for the enzymatic activity of polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) were carried out, also as isolation. From the results, it was observed that the avocados cultivars evaluated, Beatriz, Choquete and Ouro Verde showed different PPO activity and POD. The Choquete is the one which showed lower enzyme activity, and it is therefore the most recommended for agribusiness.

**Keywords:** avocado pulp, oxidative enzyme, polyphenol oxidase, peroxidase.

### 1. INTRODUÇÃO

O abacate é um fruto benéfico à saúde por ser rico em fibras, fonte de vitamina E, vitamina A, antioxidantes e minerais como ferro, potássio, magnésio e cálcio. O óleo de abacate, extraído de sua polpa madura, é rico em nutrientes que podem auxiliar na prevenção de doenças cardiovasculares e de próstata, assim como ajudar no controle da diabetes.

Todavia, por ser um fruto climatérico, apresenta alta taxa respiratória e produção elevada de etileno após a colheita, o que lhe confere alta perecibilidade sob condições ambientais (KADER, 1992). Logo, a comercialização do fruto na forma processada é um grande desafio, pois a polpa escurece rapidamente depois de cortada devido à presença de enzimas de escurecimento (BATES, 1968; GÓMEZ-LÓPEZ, 2002; LÚIZ et al., 2007).

As enzimas responsáveis pelo escurecimento do fruto são as enzimas polifenoloxidase e peroxidase, pertencentes ao grupo das oxiredutases, e podem promover uma variedade de reações (CLEMENTE, 1998). A polifenoloxidase (PPO) oxida difenóis, transformando-os em quinonas na presença do oxigênio molecular. Estes últimos compostos polimerizam

facilmente formando compostos escuros, as melaninas. Por outro lado, a ação dessa enzima pode ser considerada benéfica, uma vez que as quinonas são altamente tóxicas, o que lhes permite reduzir a ação de microrganismos invasores (CHITARRA; CHITARRA, 2005). As peroxidases (POD) são capazes de catalisar um grande número de reações oxidativas usando peróxido como substrato, ou, em alguns casos, oxigênio como aceptor de hidrogênio. Em vegetais, a peroxidase induz a mudanças negativas de sabor durante a estocagem. É considerada a enzima vegetal mais estável ao calor e sua inativação tem sido convencionalmente usada como indicador de adequação de branqueamento em processamentos vegetais (ESKIN, 1990).

O controle do escurecimento enzimático durante o armazenamento e processamento de frutos é muito importante para a preservação da aparência natural dos mesmos, assim como de suas características organolépticas, permitindo o crescimento de sua comercialização in natura e/ou de forma processada.

Conforme Ramos et al. (2003), o abacate é pouco explorado no estado do Paraná, pela pequena comercialização do fruto in natura no país. Sendo uma cultura pouco explorada, há uma falta de informações sobre o comportamento pós-colheita dos frutos. Logo, o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar as enzimas oxidativas de três cultivares de abacates, Beatriz, Choquete e Ouro Verde, cultivados no estado do Paraná.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Os frutos selecionados como objeto deste estudo foram três cultivares diferentes de abacate, Beatriz, Choquete e Ouro Verde, adquiridos na Fazenda Escola do Campus Regional do Noroeste da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em Diamante do Norte. Os frutos foram colhidos em estágio de maturação verde e “de vez”, para evitar injúrias aos frutos caso chegassem a cair antes de serem colhidos, atingindo o estágio maduro durante o armazenamento em refrigerador.

Na preparação do extrato bruto da polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) do abacate, 80g da polpa do fruto foi homogeneizada com 160mL de solução tampão fosfato de sódio 100mM com pH 7,4 para a PPO e pH 6,0 para a POD, usando um liquidificador. Em seguida, o extrato homogeneizado foi filtrado em tecido de algodão e então centrifugado a 12.000 rpm e 4°C por 20 min, onde foram separados o sobrenadante contendo PPO e POD solúvel. Os extratos da polpa de abacate foram estocados a -18°C e descongelados de acordo com a necessidade, para dar sequência à análise.

A atividade da PPO foi determinada pelo método descrito por Duang-mal & Apenten (1999) assim executada: misturou-se 0,1mL da amostra com 0,9mL de catecol a 30°C. Realizou-se leitura em espectrofotômetro ( $\lambda = 420\text{nm}$ ). A unidade da atividade de polifenoloxidase foi definida pelo aumento de uma unidade de absorbância por minuto/mL de amostra.

A atividade da POD foi determinada pelo método descrito por Clemente (1998), seguindo os passos: misturou-se na ordem 0,2mL da amostra, 2,7mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1% em solução tampão e 0,1mL de orto-dianisidina 1% em metanol. Realizou-se leitura em espectrofotômetro ( $\lambda = 460\text{nm}$ ). A unidade da atividade de peroxidase foi definida pelo aumento de uma unidade de absorbância por minuto/mL de amostra.

A determinação da concentração proteica foi realizada usando o método descrito por Bradford (1976): solução “A”: 100mg de Cromassie Brilliant Blue G250 foi dissolvido em 50mL de etanol 95% (v/v). A esta solução foi adicionado 100mL de ácido fosfórico 85% (v/v). A solução resultante foi diluída a um volume final de 1000mL. Filtrou-se a solução em papel filtro Whatman nº1. Solução “B”: 1mg de proteína bovino soro albumina (BSA) foi dissolvido em 1,0mL de solução tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,2. As soluções “A” e “B” foram utilizadas para a obtenção da curva padrão, usando diferentes concentrações da solução “B” (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90mg) e 2,5mL da solução “A”. Para a determinação de proteínas, 0,2mL da amostra eluída da coluna foi misturada a 2,5mL da solução “A” e realizou-se leitura em espectrofotômetro ( $\lambda = 595 \text{ nm}$ ) depois de 5 min. Os resultados da concentração proteica foram obtidos usando a curva padrão.

Foi realizada a semipurificação das soluções tampão e da amostra. As soluções tampão foram previamente filtradas em membrana GS em éster de celulose, 0,22 $\mu\text{m}$  de poro e 47mm de diâmetro, e em seguida foram desgaseificadas. As amostras que foram aplicadas na coluna cromatográfica foram primeiramente dialisadas em solução tampão fosfato de sódio 10mM com pH 7,4 para a PPO e pH 6,0 para a POD, por um período de 24 horas e com agitação constante. Após a diálise, as amostras foram filtradas em membrana GS em éster de celulose, 0,22 $\mu\text{m}$  de poro e 25mm de diâmetro.

Por fim, uma coluna cromatográfica C16/40 foi empacotada com o gel Sephacryl S-100 HR e equilibrada com as soluções tampão fosfato de sódio pHs 7,4 e 6,0, respectivamente, para PPO e POD.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após a obtenção dos extratos brutos das enzimas PPO e POD, determinou-se a atividade enzimática das amostras antes da eluição em coluna cromatográfica, apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1- Atividade enzimática da PPO nas variedades de abacate Beatriz, Choquete e Ouro Verde (n=3)

| Variedade  | $\Delta\text{DO}_{420\text{nm}}/\text{min/mL}$ |
|------------|--|
| Beatriz    | $2,32 \pm 0,02$                                |
| Choquete   | $1,48 \pm 0,01$                                |
| Ouro Verde | $1,72 \pm 0,01$                                |

n= número de repetições

De acordo com a Tabela 1, observa-se que a atividade enzimática da PPO difere entre os cultivares, sendo o Choquete o cultivar de menor atividade enzimática. Segundo Fenema (1998), as variações na atividade enzimática da PPO são resultado das diversidades de variedade de frutos, do estágio de maturação, das condições de cultivo e das condições pós-colheita dos mesmos.

Na Tabela 2, podemos notar que a atividade enzimática da POD também apresentou diferença entre os cultivares analisados.

Tabela 2-Atividade enzimática da POD nas variedades de abacate Beatriz, Choquete e Ouro Verde (n=3)

| Variedade  | $\Delta DO_{460nm} \text{min/mL}$ |
|------------|-----------------------------------|
| Beatriz    | 1,45 ± 0,02                       |
| Choquete   | 5,59.10 <sup>-2</sup> ± 0,01      |
| Ouro Verde | 0,12 ± 0,01                       |

n= número de repetições

Os valores obtidos são inferiores aos da atividade da PPO, no entanto para Luíz et al. (2007) a POD se comporta como sendo a enzima mais termorresistente nos produtos de origem vegetal. Contudo nas frutas, por causa das condições mais ácidas, a POD se apresenta menos estável, embora seja difícil sua inativação.

Luíz et al. (2007) realizaram um estudo sobre a cinética de inativação da polifenoloxidase e peroxidase de abacate. Para o estudo de estabilidade térmica, os extratos foram submetidos a temperaturas de 60, 65, 70, 75 e 80°C e por períodos que variaram até 10 minutos e a atividade enzimática foi determinada por espectrofotometria. Observou-se um maior declínio da atividade nos primeiros quatro minutos e depois deste período continuou diminuindo de forma mais lenta. Portanto, a temperatura influencia de maneira significativa na inativação das enzimas e é uma solução na conservação de produtos, durante sua elaboração e armazenamento.

As frações eluídas da coluna cromatográfica foram analisadas quanto à atividade enzimática e também proteína. A determinação proteica é realizada para verificar se a separação efetuada na coluna foi eficiente e se houve purificação das enzimas. Para tal, fez-se primeiramente uma curva padrão para proteína (Figura 1) com os dados da Tabela 3, utilizando o método de Bradford (1976).

Tabela 3-Curva padrão de proteína (n=3)

| Concentração de BSA (mg/mL) | $\Delta DO_{595nm} \text{min/mL}$ |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| 0                           | 0,0008 ± 0,0008                   |
| 0,1                         | 0,1929 ± 0,0128                   |
| 0,2                         | 0,3934 ± 0,0038                   |
| 0,4                         | 0,5926 ± 0,0094                   |
| 0,6                         | 0,9427 ± 0,0209                   |
| 0,8                         | 1,1194 ± 0,0157                   |
| 0,9                         | 1,1680 ± 0,0139                   |

n= número de repetições

A equação da curva de calibração para proteína BSA apresenta-se a seguir:

$$y = 1,331x + 0,052$$

$$R^2 = 0,984$$

Sendo y a absorbância lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595nm, encontra-se a concentração de proteína na amostra, isolando o x da equação acima. Assim sendo, utiliza-se a equação abaixo para o cálculo da concentração proteica na amostra:

$$x = [\text{proteína}] = (\text{ABS} - 0,052) / 1,331$$

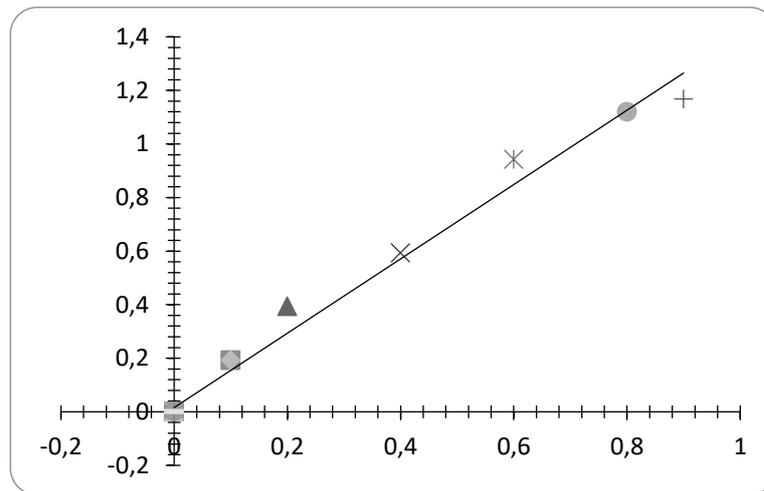


Figura 1- Curva padrão de calibração para proteína

As Tabelas 4, 5 e 6 trazem os resultados da atividade enzimática da polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) e proteína das frações eluídas em coluna cromatográfica C16/40 com gel Sephacryl S-100 HR e velocidade de fluxo de 30mL/h para a variedade de abacate Ouro Verde.

**Tabela 4-**Atividade da polifenoloxidase (PPO) para a cultivar Ouro Verde nas frações eluída em Sephacryl S-100 HR (n=3)

| Número da fração* | $\Delta DO_{420nm} \text{min/mL (PPO)}$ |
|-------------------|---|
| 1                 | 0,0000 ± 0,0000                         |
| 2                 | 0,0000 ± 0,0000                         |
| 3                 | 0,0000 ± 0,0000                         |
| 4                 | 0,0000 ± 0,0000                         |
| 5                 | 0,0000 ± 0,0000                         |
| 6                 | 0,0000 ± 0,0000                         |
| 7                 | 0,0000 ± 0,0000                         |

|    |                 |
|----|-----------------|
| 8  | 0,0000 ± 0,0000 |
| 9  | 0,0780 ± 0,0016 |
| 10 | 0,2849 ± 0,0138 |
| 11 | 0,2568 ± 0,0146 |
| 12 | 0,3812 ± 0,0333 |
| 13 | 0,3578 ± 0,0137 |
| 14 | 0,0144 ± 0,0048 |
| 15 | 0,0013 ± 0,0021 |
| 16 | 0,0011 ± 0,0007 |
| 17 | 0,0001 ± 0,0003 |
| 18 | 0,0005 ± 0,0001 |
| 19 | 0,0000 ± 0,0000 |
| 20 | 0,0000 ± 0,0000 |

n= número de repetições

\*O volume de cada fração é de 5mL

Tabela 5-Atividade da peroxidase (POD) para a cultivar Ouro Verde nas frações eluída em Sephacryl S-100 HR (n=3)

| Número da fração* | $\Delta DO_{460nm} \text{min/mL (POD)}$ |
|-------------------|---|
| 1                 | 0,0000 ± 0,0000                         |
| 2                 | 0,0000 ± 0,0000                         |
| 3                 | 0,0000 ± 0,0000                         |
| 4                 | 0,0000 ± 0,0000                         |
| 5                 | 0,0000 ± 0,0000                         |
| 6                 | 0,0000 ± 0,0000                         |
| 7                 | 0,0000 ± 0,0000                         |
| 8                 | 0,0208 ± 0,0115                         |
| 9                 | 0,3594 ± 0,0093                         |
| 10                | 0,2900 ± 0,0244                         |

---

|    |                 |
|----|-----------------|
| 11 | 0,0139 ± 0,0031 |
| 12 | 0,0121 ± 0,0013 |
| 13 | 0,0146 ± 0,0020 |
| 14 | 0,0195 ± 0,0287 |
| 15 | 0,0061 ± 0,0030 |
| 16 | 0,0000 ± 0,0000 |
| 17 | 0,0000 ± 0,0000 |
| 18 | 0,0000 ± 0,0000 |
| 19 | 0,0000 ± 0,0000 |
| 20 | 0,0000 ± 0,0000 |

---

n= número de repetições

\*O volume de cada fração é de 5mL

Tabela 6-Teor de proteína nas frações eluídas da coluna em gel Sephacryl S-100 HR (n=3)

| Número da fração* | Concentração Proteica (mg/mL) |
|-------------------|-------------------------------|
| 1                 | 0,0158 ± 0,0270               |
| 2                 | 0,2945 ± 0,0824               |
| 3                 | 0,2983 ± 0,0845               |
| 4                 | 0,4165 ± 0,0454               |
| 5                 | 0,3065 ± 0,0329               |
| 6                 | 0,3959 ± 0,0480               |
| 7                 | 0,2935 ± 0,0115               |
| 8                 | 0,3413 ± 0,0259               |
| 9                 | 0,3416 ± 0,0189               |
| 10                | 1,1873 ± 0,0458               |
| 11                | 0,4430 ± 0,1930               |
| 12                | 0,9890 ± 0,0739               |

---

|    |                     |
|----|---------------------|
| 13 | $0,5309 \pm 0,1406$ |
| 14 | $0,4929 \pm 0,1724$ |
| 15 | $0,2697 \pm 0,0263$ |
| 16 | $0,0418 \pm 0,1055$ |
| 17 | $0,1129 \pm 0,0364$ |
| 18 | $0,1690 \pm 0,0647$ |
| 19 | $0,0346 \pm 0,0424$ |
| 20 | $0,1480 \pm 0,0418$ |

n= números

\*O volume de cada fração é de 5mL

De acordo com a tabela 4 observa-se que a atividade da polifenoloxidase concentra-se nas frações de número 9 a 14, ou seja, nos volumes de eluição de 45 a 70mL e de acordo com a tabela 5 observa-se que a atividade da peroxidase concentra-se nas frações de número 8 a 15, ou seja, também nos volumes de eluição de 40 a 75mL. Os resultados desse primeiro passo de purificação das enzimas polifenoloxidase e peroxidase em coluna cromatográfica em gel Sephacryl S-100 HR, tornam-se mais evidentes com as Figuras 2 e 3.

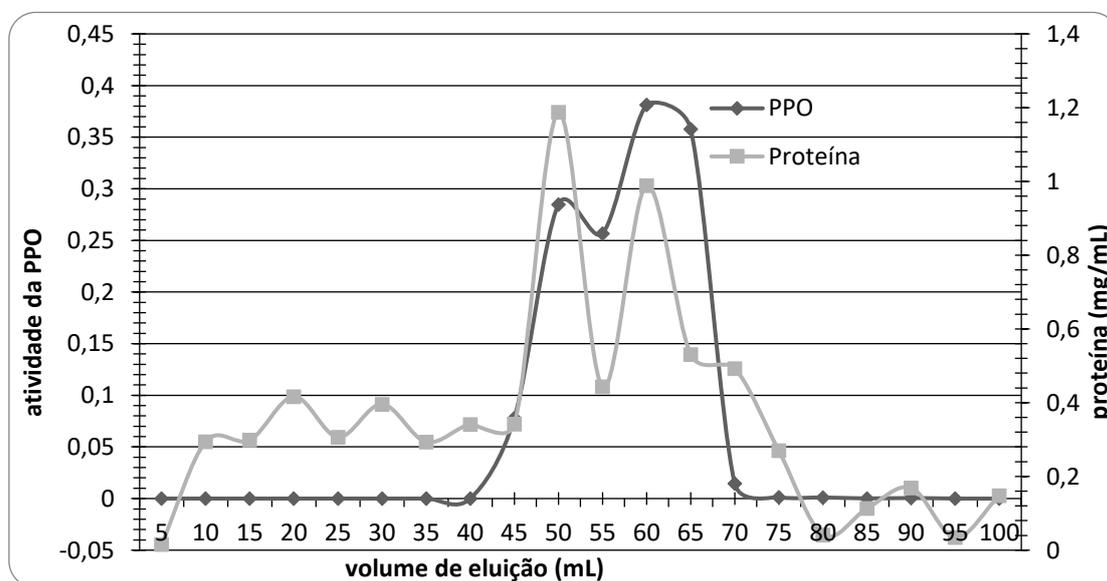


Figura 2- Atividade enzimática da polifenoloxidase e concentração protéica do extrato bruto de abacate da variedade Ouro Verde (Sephacryl S-100 HR).

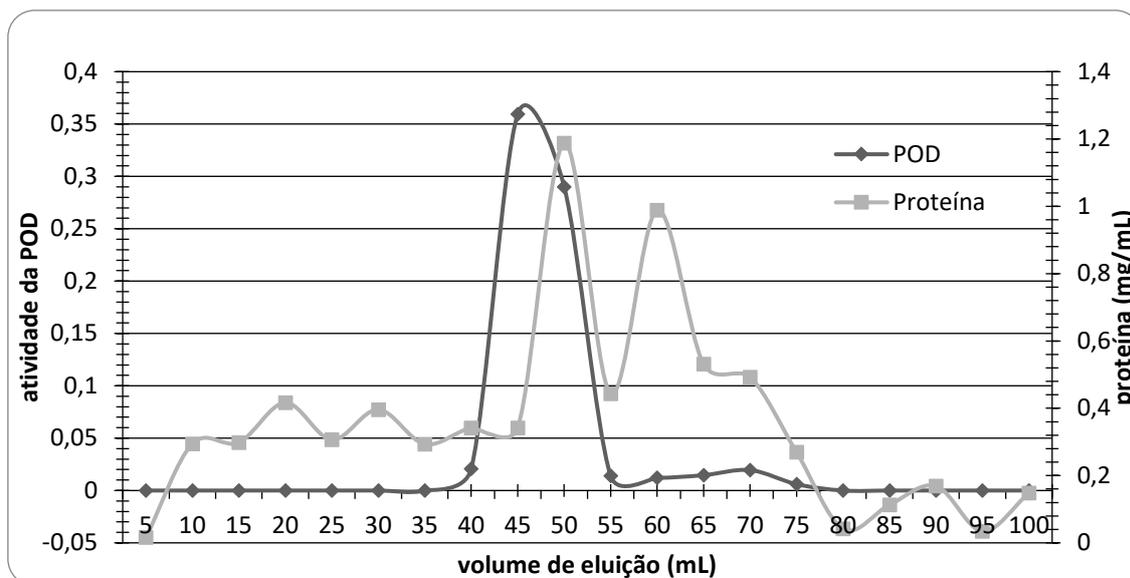


Figura 3- Atividade enzimática da peroxidase e concentração protéica do extrato bruto de abacate da variedade Ouro Verde (Sephacryl S-100 HR).

Os resultados da aplicação da amostra em coluna de gel Sephacry S-100 HR propiciaram o início da purificação das enzimas oxidativas em estudo - a polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) da variedade de abacate Ouro Verde.

#### 4. CONCLUSÃO

Diante dos resultados alcançados, observou-se que os cultivares de abacates avaliados, Beatriz, Choquete e Ouro Verde, demonstraram atividade de PPO e POD diferentes, ilustrando a necessidade de estudo de diversas variedades dentro de uma mesma espécie de fruto, visto que na maioria das vezes, estas poderão apresentar comportamentos distintos.

A coluna cromatográfica em gel Sephacryl S-100 HR apresentou eficiência como método inicial de purificação de enzimas.

Dentre os cultivares analisados, o Choquete é o que apresenta mais baixa atividade enzimática, sendo, portanto, o mais recomendado para a agroindústria, proporcionando processos industriais mais simples e com menores perdas.

#### AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo auxílio financeiro e bolsas de pesquisa para a execução deste trabalho.

#### REFERÊNCIAS

**BATES, R.P.** The retardation of enzymatic browning in avocado puree and guacamole. Proc. Fla. Sate Hort. Soc., 81: 230-235, 1968.

**BRADFORD, M. M.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.

**CANTO, W. L.; SANTOS, L. C.; TRAVAGLIN, M. E .M.** Óleo de Abacate: extração, usos e seus mercados atuais no Brasil e na Europa. Campinas: ITAL, 143 p, 1980.

**CHITARRA, M. I. F. ; CHITARRA, A. B.** Pós-colheita de frutas e hortaliças. 2. ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, p. 688, 2005.

**CLEMENTE, E.** Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. *Phytochemistry*, v. 49, n. 1, p. 29-36, 1998.

**CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M.** Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 32:167-171, 1998.

**DUANG-MAL, K.; OXUSU APENTEN, R. K.** A comparative study of polyphenoloxidases from taio (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var *Romanus*). *Food Chemistry*, v. 64, p. 351-359, 1999.

**ESKIN, N. A. M.** *Biochemistry of Foods*. 2ª edição. Academic Press, Canadá Serie, p. 506-507, 1990.

**FUJITA, S.** et al. Purificación and properties of polyphenoloxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Journal Agriculture and Food Chemistry*, v. 43, n. 5, p. 1138-1142, 1995.

**GÓMEZ-LOPEZ, V.M.** Some biochemical proprieties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado. *Food Chemistry*, 77:163-169, 2002.

**KADER, A, A.** *Postharvest technology of horticultural crops*. Okland: University of California, 292p, 2002.

**LUÍZ, R.C.; HIRATA, T.A.M.; CLEMENTE, E.** Cinética de inativação da polifenoloxidase e peroxisase de abacate (*Persea americana* Mill.), 2007. *Ciência e Agrotecnologia*, 31(6):1766-1773.

**RAMOS, V. H. V.; GENÚ, P. J. C.; PINTO, A. C. Q.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FERREIRA, F. R.** Avaliação de acessos de abacate nas condições de cerrado de Brasília, DF. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. n.112. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003.