



ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE POLIFENOLOXIDASE E PEROXIDASE EM POLPA DE ABACATES

Lígia Gomes Melchior (PIBIC/CNPq/UEM), Edmar Clemente (Orientador), e-mail: igimelchior@hotmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Engenharia de Alimentos/Maringá, PR.

Ciências Agrárias; Ciência e Tecnologia de Alimentos

Palavras-chave: polpa de abacate, polifenoloxidase, peroxidase.

Resumo:

O abacate é um fruto tropical muito benéfico à saúde. No entanto, pouco utilizado na indústria de alimentos, uma vez que sua preservação é comprometida pelo escurecimento enzimático de sua polpa, um problema que altera a coloração e sabor. A redução ou inativação da atividade de enzimas oxidativas promotoras desse escurecimento poderão beneficiar o setor industrial, permitindo comercialização da polpa ou produtos do fruto com reduzida ou nenhuma adição de conservantes químicos e sem alterar suas qualidades organolépticas originais. Neste trabalho foram realizadas avaliações da atividade enzimática da polifenoloxidase e peroxidase de três variedades de abacate cultivadas do estado do Paraná, e isolamento por coluna cromatográfica da cultivar Ouro Verde. Dentre os cultivares analisadas, o Choquete é o que apresenta mais baixa atividade enzimática para polifenoloxidase e peroxidase.

Introdução

A comercialização do abacate na forma processada é um grande desafio, pois sua polpa escurece rapidamente depois de cortada devido à presença de enzimas de escurecimento.

As enzimas responsáveis pelo escurecimento do fruto são as enzimas polifenoloxidase e peroxidase. A polifenoloxidase (PPO) oxida difenóis, transformando-os em quinonas na presença do oxigênio molecular. Estes últimos compostos polimerizam facilmente formando compostos escuros, as melaninas.

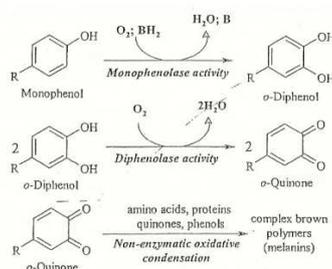


Figura 1-Reações catalisadas pela PPO e formação de melaninas.

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.

substrato_{reduzido} + H₂O₂ (peroxidase + cofator)-----> substrato_{oxidado} + H₂O

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). Sendo uma cultura pouco explorada, há uma falta de informações sobre o comportamento pós-colheita do abacate. Logo, o objetivo deste trabalho foi determinar e isolar as enzimas oxidativas de cultivares de abacates cultivados no estado do Paraná.

Materiais e métodos

Após obtenção do extrato bruto da polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) do abacate para as cultivares Beatriz, Choquete e Ouro Verde, a atividade da PPO foi determinada pelo método descrito por Fujita (1995) e a atividade da POD, pelo método descrito por Clemente (1998). As amostras da cultivar Ouro Verde foram semipurificadas por meio de diálise em solução tampão fosfato de sódio e em seguida filtradas em membrana GS em éster de celulose. As amostras foram então eluídas em coluna cromatográfica C16/40 empacotada com gel Sephacryl S-200 HR com velocidade de fluxo de 30mL/h. Após eluição, a atividade enzimática da PPO foi determinada pelo método descrito por Fujita (1995), a atividade da POD pelo método descrito por Clemente (1998) e a concentração protéica por Bradford (1976).

Resultados e Discussão

A atividade enzimática das amostras antes da eluição em coluna cromatográfica apresenta-se nas tabelas abaixo.



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

Varietade	$\Delta DO_{420nm}/min/mL$
Beatriz	$2,32 \pm 0,02$
Choquete	$1,48 \pm 0,01$
Ouro Verde	$1,72 \pm 0,01$

n= número de repetições

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

Varietade	$\Delta DO_{460nm}/min/mL$
Beatriz	$1,45 \pm 0,02$
Choquete	$5,59 \cdot 10^{-2} \pm 0,01$
Ouro Verde	$0,12 \pm 0,01$

n= número de repetições

Nas figuras 2 e 3 podem ser observados os resultados da atividade enzimática assim como o teor de proteínas nas frações eluídas da coluna cromatográfica C16/40 com Sephacryl S-200 HR, para a variedade de abacate Ouro Verde.

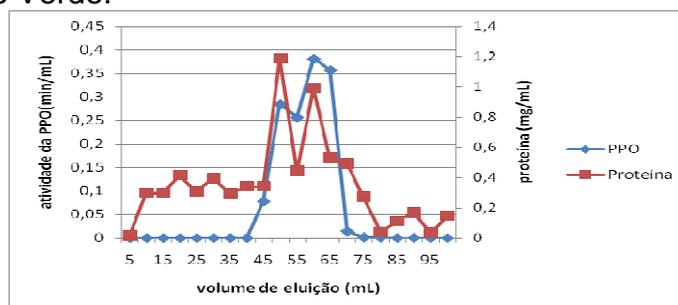


Figura 2- Atividade enzimática da polifenoloxidase e concentração protéica do extrato bruto de abacate da variedade Ouro Verde (Sephacryl S-100 HR).

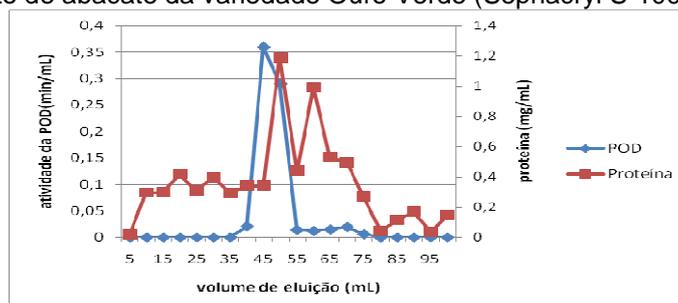


Figura 3- Atividade enzimática da peroxidase e concentração protéica do extrato bruto de abacate da variedade Ouro Verde (Sephacryl S-100 HR).

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. Tais 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 analisadas. Os valores obtidos são inferiores aos da atividade da PPO.



Os resultados da aplicação da amostra em coluna de gel Sephacry S-200 HR propiciou o início da purificação das enzimas oxidativas em estudo, a polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) da variedade de abacate Ouro Verde.

Conclusões

Diante dos resultados alcançados, observou-se que os cultivares de abacates avaliados, Beatriz, Choquete e Ouro Verde, demonstraram atividade de PPO e POD diferentes, demonstrando a necessidade de estudo de diversas variedades dentro de uma mesma espécie de fruto. A coluna cromatográfica em gel Sephacryl S-200 HR apresentou eficiência como método inicial de purificação de enzimas.

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

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.

Referências

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

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.

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

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.