

CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DA POLIFENOLOXIDASE E PEROXIDASE DE ABACATE (*Persea americana* MILL.)

Kinetic of inactivation of polyphenoloxidase and peroxidase of avocado (*Persea americana* Mill.)

Rúbia Caroline Luíz¹, Talita Akemi Medeiros Hirata², Edmar Clemente³

RESUMO

Extratos enzimáticos foram preparados a partir da polpa de abacate (*Persea americana* Mill.) dos cultivares Quintal, Fortuna e Choquete, em dois estádios de maturação (verde e maduro). A polpa de abacate (150,00g) foi homogeneizada em liquidificador, com 300 mL de solução tampão fosfato de sódio 100mM em pH 7,4 para polifenoloxidase (PPO) e pH 6,0 para peroxidase (POD). A peroxidase ionicamente ligada foi extraída usando solução de NaCl 1,0M, em tampão fosfato de sódio 100mM pH 6,0. Para o estudo da estabilidade térmica, os extratos foram submetidos a temperaturas de 60, 65, 70, 75 e 80°C e por períodos que variaram de 1 à 10 minutos e a atividade enzimática foi determinada por espectrofotometria ($\lambda = 395\text{nm}$ para PPO e $\lambda = 460\text{nm}$ para POD). Pode-se observar que o declínio rápido da atividade das enzimas era maior nos primeiros quatro minutos e após esse período, com o aumento da temperatura e do tempo, a atividade continuou diminuindo, porém de forma mais lenta. A energia de ativação na faixa de temperatura estudada para as porções termolábil e termorresistente, apresentou valores dentro da faixa 12-100 kcal/mol.

Termos para indexação: Abacate; polifenoloxidase; peroxidase; *Persea americana*.

ABSTRACT

Enzymatic extracts were prepared from the avocado pulp (*Persea americana* Mill.), using the cultivars Quintal, Fortuna and Choquete, in two different maturation stages (green and mature avocados). The avocado pulp (150,00g) was homogenized in blender with 300 mL of sodium phosphate buffer 100mM at pH 7.4 for polyphenoloxidase (PPO) and pH 6.0 for peroxidase (POD). The peroxidase ionically bound was extracted using NaCl solution 1.0M in sodium phosphate buffer 100mM pH 6.0. For the study of the thermal stability the extracts were submitted at temperatures of 60, 65, 70, 75 and 80°C for periods that had a variation from 1 to 10 minutes and the enzymatic activity was determined using a spectrophotometer ($\lambda = 395\text{nm}$ for PPO and $\lambda = 460\text{nm}$ for POD). It was possible to observe a fast decline of the enzyme activity in the first four minutes, after this period, with the increase of the temperature and time, the activity continued decreasing, however in a slower way. The activation energy in the studied temperature showed for the portions heat labile and heat resistant presented values inside 12-100 kcal/mol.

Index terms: Avocado; polyphenoloxidase; peroxidase; *Persea americana*.

(Recebido em 18 de julho de 2006 e aprovado em 22 de junho de 2007)

INTRODUÇÃO

O abacate (*Persea americana* Mill.) é uma das frutas tropicais altamente valiosas e a expansão do seu consumo é justificado por suas qualidades organolépticas, seu valor nutritivo e a riqueza em suas vitaminas.

As reações enzimáticas são muito importantes em alimentos, delas depende não só a formação de compostos altamente desejáveis, mas podem também, ter conseqüências indesejáveis. As reações enzimáticas ocorrem não só no alimento natural, mas também durante seu processamento (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

Esses diferentes comportamentos são de utilidade para a indústria de alimentos, pois através deles se

encontram as melhores soluções para o processamento (FORTUNADO, 2002). A inativação enzimática, através do tratamento térmico, é uma das soluções encontradas pela indústria alimentícia, sendo esse recurso utilizado principalmente na conservação do produto, em seu período de elaboração e armazenamento.

A otimização do processo térmico em alimentos que contenham enzimas naturais termorresistentes se torna difícil, pelo fato dessas enzimas apresentarem uma dependência com a temperatura, da mesma ordem de grandeza da dependência dos nutrientes e fatores de qualidade (cor, textura). No caso de enzimas, o objetivo do processamento térmico é sua inativação, porém no caso

¹Engenheira de Alimentos – Laboratório de Bioquímica de Alimentos/DQI – Universidade Estadual de Maringá/UEM – Avenida Colombo, 5690, Zona 7 – 87020-900 – Maringá, PR – rubiaclaf@yahoo.com.br

²Engenheira de Alimentos – Laboratório de Bioquímica de Alimentos/DQI – Universidade Estadual de Maringá/UEM – Avenida Colombo, 5690, Zona 7 – 87020-900 – Maringá, PR – talitaakemi@yahoo.com.br

³Ph.D em Bioquímica de Alimentos – Universidade Estadual de Maringá/UEM – Avenida Colombo, 5690, Zona 7 – 87020-900 – Maringá, PR – eclemente@uem.br

de nutrientes e fatores de qualidade, o objetivo é sua retenção máxima (LUND, 1975). Segundo Lund (1975), no cálculo do processo térmico, baseado na inativação enzimática, a enzima mais termorresistente, que pode alterar a qualidade do produto durante o armazenamento, é usada como parâmetro no estabelecimento do processo. Entre esses alimentos encontram-se as frutas, que em geral contêm enzimas como peroxidase, pectinesterase e polifenoloxidase que são termorresistentes e são responsáveis pelas mudanças indesejáveis nos produtos enlatados dessas frutas (RAMASWAMAMY, 1989).

Quando um consumidor vai comprar um produto o primeiro impacto na qualidade é a aparência visual (EVANGELISTA, 1998). O controle do escurecimento enzimático durante o armazenamento e processamento de frutos é muito importante para a preservação da aparência natural dos mesmos. A preservação da polpa de abacate é afetada principalmente pelo escurecimento enzimático catalisado pela polifenoloxidase (PPO) e pelas reações degradativas da peroxidase (POD).

O escurecimento observado quando a maioria das frutas e dos vegetais é amassada, cortada ou triturada, é oriunda de reações catalisadas pela enzima polifenoloxidase (PPO). A ação dessa enzima em várias frutas e vegetais *in natura* acarreta perdas econômicas consideráveis, além de diminuição da qualidade nutritiva e alteração do sabor (ARAÚJO, 1999). A peroxidase age sobre as substâncias que produzem cores vivas na oxidação, mas ela pode promover uma grande variedade de reações de biodegradação e com isso apresenta um alto grau de versatilidade. De modo geral, é aceito que a peroxidase ao contrário de outras enzimas, que são inativadas pelo calor, permanece ativa. Logo, a atividade da peroxidase em muitas indústrias de alimentos é usada como índice de branqueamento (LING & LUND, 1978).

No presente trabalho estudaram-se as enzimas POD, PPO em polpa de abacate, em três variedades e em estágios diferentes de maturação, avaliando a cinética de inativação dessas enzimas e a obtenção de informações que beneficiarão o setor industrial.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas três variedades de abacate: Quintal, Fortuna e Choquete, colhidas na Fazenda Escola da UEM, do Campus Regional do Noroeste, em Diamante do Norte/PR, e levados para o Laboratório de Bioquímica da UEM onde foram selecionadas, de acordo com o estágio de maturação (verde e maduro) e sanitizadas.

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico.

Para a preparação do extrato bruto do abacate, homogeneizou-se 150,00g da polpa de abacate com 300 mL de solução tampão fosfato de sódio 100mM (pH 7,4 para a PPO e pH 6,0 para a POD) e em seguida os filtrados foram centrifugados (12.000rpm, a 4 °C por 20 minutos). Os sobrenadantes contendo PPO e POD solúvel foram armazenados a -18 °C. Para a extração da peroxidase ionicamente (PIN) ligada utilizou-se o resíduo originário da centrifugação, quando da obtenção do extrato de peroxidase solúvel, POD. O resíduo foi ressuspenso em solução de NaCl 1,0 M em tampão fosfato de sódio 100mM pH 6,0 e foi novamente centrifugado (12.000rpm, a 4°C por 20 minutos) e o sobrenadante, denominado PIN, armazenado a -18°C e o resíduo descartado.

A atividade da PPO foi determinada pelo método descrito por Fujita (1995) e da POD pelo método descrito por Clemente (1998).

Os extratos enzimáticos concentrados foram submetidos a tratamento térmico nas temperaturas de 60 °, 65 °, 70 °, 75 ° e 80 °C, por períodos variando de 1 a 10 minutos, e, posteriormente, determinando-se a atividade enzimática por espectrofotometria.

Foram calculados os seguintes parâmetros cinéticos para a PPO e POD: D (Tempo de redução decimal), K (Constante de velocidade de inativação), Z (Fator de dependência da temperatura) e EA (Energia de ativação). Para o cálculo do tempo de redução decimal (D) e da constante de velocidade de inativação térmica (K) utilizou-se o modelo descrito por Ling & Lund (1978). Calculou-se a energia de ativação das porções termolábil e termorresistente baseada na metodologia descrita por Ramaswamy et al. (1989).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes dos extratos enzimáticos da polpa de abacate nos estágios de maturação verde e maduro serem submetidos ao tratamento térmico, as atividades das enzimas PPO, POD solúvel e PIN foram avaliadas. Possibilitando observar-se que a atividade enzimática da polifenoloxidase aumentou à medida que o fruto atingiu o climatério, apesar de que na variedade Choquete isso não ter sido observado. Demonstrando que a atividade enzimática pode variar, não somente entre frutos, mas entre variedades da mesma espécie. Além disso, observou-se que a variedade Choquete foi a que apresentou uma maior atividade para a enzima polifenoloxidase, no estágio de maturação verde, o que pode observar-se na tabela 1.

Com o tratamento térmico dos extratos, verificou-se uma relação inversa entre a temperatura e o tempo de aquecimento, pois quanto mais alta a temperatura menor era o tempo de aquecimento necessário para a inativação térmica. Os resultados encontrados para inativação térmica da polifenoloxidase, peroxidase e peroxidase ionicamente ligada podem observar-se nas tabelas 2, 3 e 4 respectivamente.

Para a enzima PPO, as três variedades analisadas obtiveram o mesmo comportamento em relação à inativação térmica, por exemplo, para o 'Quintal verde', onde após seis minutos de aquecimento a 60 °, 65 ° e 70 °C houve inativação de 10,85%; 12,02% e 25,97%, respectivamente, dessa enzima. A 75 ° e 80 °C, após quatro minutos de aquecimento, inativou-se 32,56% e 38,37%. Observou-se o mesmo comportamento para o 'Quintal maduro', após seis minutos de aquecimento a 60 ° e 65 °C, a porcentagem de inativação foi de 17,75 e 26,70, respectivamente, enquanto que para as temperaturas de 70 °, 75 ° e 80 °C, após quatro minutos, a inativação foi de 49,62%, 47,04% e 50,79%, respectivamente. Para as variedades Quintal e Fortuna notou-se que a porcentagem de inativação aumentou à medida que os frutos atingiam o climatério, apresentando, portanto uma maior atividade enzimática.

Tanto para a peroxidase e peroxidase ionicamente ligada, analisadas apenas em uma variedade, o Choquete, observou-se que quanto maior a temperatura menor o tempo necessário para o declínio da atividade delas. Esse comportamento apresentou-se bem mais visível para a PIN, pois na polpa de abacate Choquete verde e maduro, após dez minutos de aquecimento a temperatura de 60 °C

inativou apenas 8,08% e 9,40%, respectivamente, enquanto que a 80 °C, em um tempo de 0,5 minutos a inativação foi de 28,19% e 20,27%, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Fortunato (2002).

A atividade de peroxidase solúvel foi maior para os frutos no estágio verde do que no fruto maduro, sendo que a fração ionicamente ligada apresentou um resultado inverso, o que pode ser devido a uma maior participação da fração solúvel, na síntese de proteínas.

Foi comprovado, de um modo geral, o efeito da temperatura sobre o tempo de aquecimento necessário à inativação térmica da polifenoloxidase e da peroxidase (fração solúvel e ionicamente ligada), ou seja, quanto maior a temperatura menor o tempo de aquecimento necessário.

A peroxidase se comporta como sendo a enzima mais termorresistente, nos produtos de origem vegetal. Contudo nas frutas, por causa das condições mais ácidas, a peroxidase se apresenta menos estável, embora seja difícil sua inativação. Nos resultados encontrados, o máximo de porcentagem de inativação que se conseguiu, para a peroxidase foi de 34,17% a uma temperatura de 80 °C, em um tempo de 10 minutos, para a variedade Choquete, no estágio de maturação verde.

Os resultados da inativação térmica dos extratos enzimáticos contendo PPO, POD e PIN para a fração termorresistente observam-se nas figuras 1, 2 e 3, onde Log (%P) significa o logaritmo da porcentagem da atividade enzimática (P) que permanece ativa ao longo do tempo, e com o aumento da temperatura.

Tabela 1 – Atividade de PPO, POD e PIN em polpa de abacate (n = 3).

Variedade	PPO	POD	PIN
	$\Delta DO_{395nm} \text{ min/mL} \pm \delta$	$\Delta DO_{460nm} \text{ min/mL} \pm \delta$	$\Delta DO_{460nm} \text{ min/mL} \pm \delta$
Quintal Verde	2,58 ± 0,02	-	-
Quintal Maduro	2,96 ± 0,01	-	-
Fortuna Verde	2,13 ± 0,01	-	-
Fortuna Maduro	2,40 ± 0,02	-	-
Choquete Verde	3,84 ± 0,01	2,96 ± 0,02	3,01 ± 0,01
Choquete Maduro	2,40 ± 0,01	2,85 ± 0,01	3,20 ± 0,02

n = número de repetições, δ = desvio padrão

Tabela 2 – Média da inativação térmica da enzima PPO, em três variedades de abacate, em dois estádios de maturação (n=3).

Extrato enzimático	Tempo(min)	0	1	2	3	4	5	6
	Temperatura	% de Inativação						
	60°C							
Quintal Verde		0	4,27	5,82	4,43	8,53	9,69	10,85
Quintal Maduro		0	5,26	9,38	12,33	11,47	13,40	17,75
Fortuna Verde		0	7,74	2,11	7,74	4,13	11,68	13,47
Fortuna Maduro		0	11,95	15,99	19,73	18,07	20,15	22,17
Choquete Verde		0	5,26	9,38	12,33	11,47	13,40	14,75
Choquete Maduro		0	13,14	20,17	13,48	21,66	21,67	22,59
	65°C							
Quintal Verde		0	0,78	1,55	4,65	8,91	9,30	12,02
Quintal Maduro		0	2,66	8,80	10,16	12,25	20,93	26,70
Fortuna Verde		0	6,43	7,46	8,01	7,93	10,91	14,08
Fortuna Maduro		0	17,36	18,86	16,53	17,24	21,61	24,19
Choquete Verde		0	2,66	8,80	10,16	12,25	20,93	26,70
Choquete Maduro		0	19,05	19,84	23,01	31,86	32,03	38,52
	70°C							
Quintal Verde		0	8,91	12,79	14,73	16,67	18,60	25,97
Quintal Maduro		0	21,40	22,65	39,54	49,62	60,15	54,68
Fortuna Verde		0	9,95	12,67	12,76	18,35	17,51	19,25
Fortuna Maduro		0	23,23	31,64	32,14	34,81	36,22	36,80
Choquete Verde		0	21,40	22,65	39,54	49,62	60,15	54,68
Choquete Maduro		0	22,46	24,21	26,04	31,31	35,19	42,51
	75°C							
Quintal Verde		0	8,91	20,54	29,07	32,56	34,11	34,11
Quintal Maduro		0	0,78	21,5	38,73	47,04	49,20	54,80
Fortuna Verde		0	16,56	23,18	16,94	23,18	22,34	26,42
Fortuna Maduro		0	29,64	38,34	36,47	34,30	37,72	37,72
Choquete Verde		0	0,78	21,50	38,73	47,04	49,20	54,80
Choquete Maduro		0	24,13	27,41	28,04	30,28	36,52	45,46
	80°C							
Quintal Verde		0	16,67	14,73	31,01	38,37	43,80	48,84
Quintal Maduro		0	12,74	25,33	44,90	50,79	56,74	59,26
Fortuna Verde		0	21,44	25,39	27,26	26,40	33,18	39,98
Fortuna Maduro		0	26,73	32,72	35,89	41,13	43,56	44,63
Choquete Verde		0	12,74	25,33	44,90	50,79	56,74	59,78
Choquete Maduro		0	28,95	24,38	45,67	54,24	53,49	55,16

n= número de repetições

Tabela 3 – Média da inativação térmica da enzima POD, na variedade Choquete, em dois estádios de maturação (n=3).

Extrato enzimático	Tempo(min)	0	0,5	1	3	6	10
	Temperatura	% de Inativação					
	60°C						
Choquete Verde		0	5,57	11,45	14,73	13,90	17,70
Choquete Maduro		0	2,66	4,25	7,52	8,67	8,61
	65°C						
Choquete Verde		0	8,62	10,23	17,92	19,28	20,27
Choquete Maduro		0	0,07	4,59	12,33	14,12	17,38
	70°C						
Choquete Verde		0	9,89	17,05	20,05	19,91	21,56
Choquete Maduro		0	7,05	12,94	15,22	15,38	16,51
	75°C						
Choquete Verde		0	14,68	18,98	24,75	22,85	26,46
Choquete Maduro		0	16,31	20,34	25,06	26,58	29,15
	80°C						
Choquete Verde		0	16,72	18,34	27,73	31,84	34,17
Choquete Maduro		0	16,78	24,59	26,57	30,92	32,36

n= número de repetições

Tabela 4 – Média da inativação térmica da enzima POD ionicamente ligada, em três variedades de abacate, em dois estádios de maturação (n=3).

Extrato enzimático	Tempo(min)	0	0,5	1	3	6	10
	Temperatura	% de Inativação					
	60°C						
Choquete Verde		0	1,16	4,36	3,37	6,43	8,08
Choquete Maduro		0	3,84	8,08	6,37	9,11	9,40
	65°C						
Choquete Verde		0	1,43	2,54	3,22	9,77	16,18
Choquete Maduro		0	4,66	8,90	9,31	10,81	9,38
	70°C						
Choquete Verde		0	10,91	11,59	18,47	14,20	22,57
Choquete Maduro		0	15,66	19,55	21,99	29,45	31,00
	75°C						
Choquete Verde		0	21,70	31,18	36,21	41,48	42,84
Choquete Maduro		0	16,85	20,68	21,96	27,05	34,82
	80°C						
Choquete Verde		0	28,19	33,91	35,29	46,24	46,60
Choquete Maduro		0	20,27	22,47	28,70	33,68	40,00

n= número de repetições

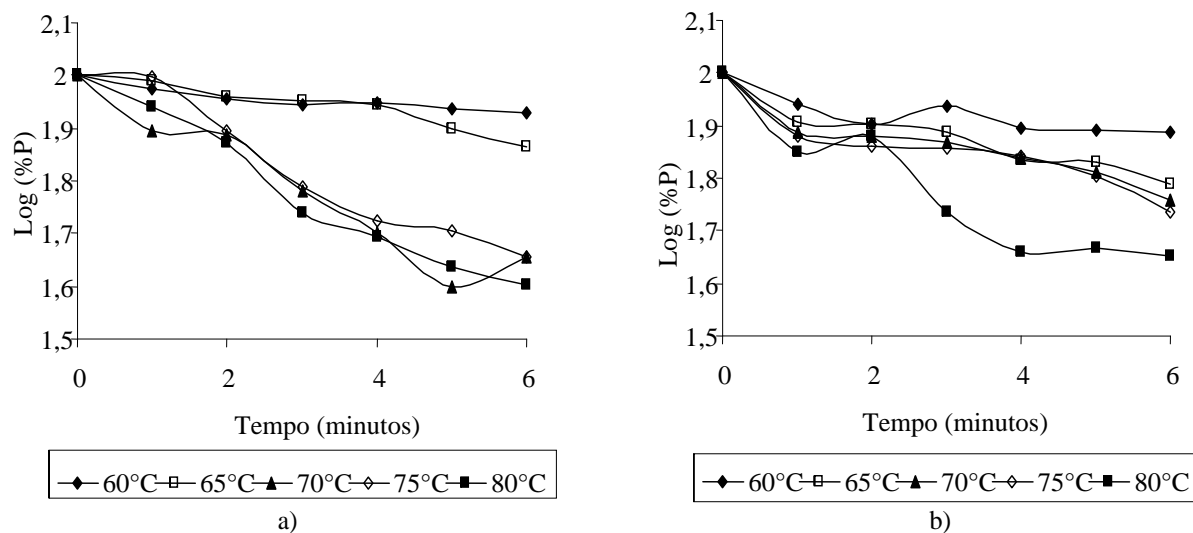


Figura 1 – Inativação térmica da PPO de polpa de abacate (Variedade Choquete) a 60, 65, 70, 75 e 80 °C. (a - Abacate Verde, b - Abacate Maduro).

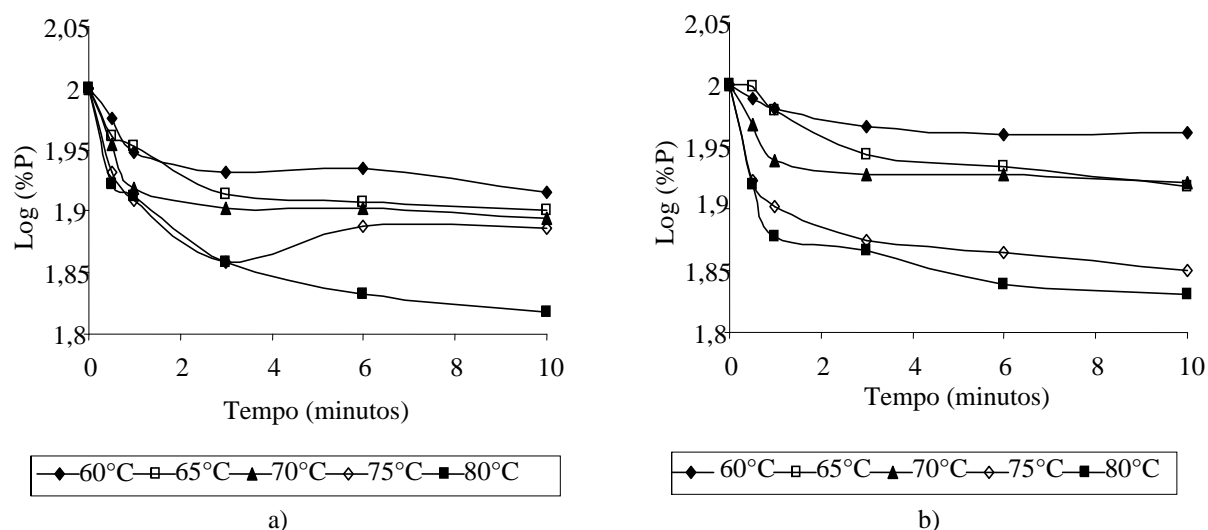


Figura 2 – Inativação térmica da POD de polpa de abacate (Variedade Choquete) a 60, 65, 70, 75 e 80 °C. (a - Abacate Verde, b - Abacate Maduro).

Os estudos da inativação térmica apresentam mudança na inclinação das curvas, indicando a presença de duas porções das enzimas, uma termolábil e outra termorresistente.

Nas figuras 1, 2 e 3 pode-se observar o efeito da temperatura sobre o tempo necessário para a inativação

térmica das enzimas PPO, POD e PIN, pois conforme a temperatura aumentava, o tempo de aquecimento para inativação diminuía, fato esse também observado no comportamento da porção termolábil dessas enzimas.

Através dos parâmetros cinéticos (D, K e Z) calculou-se a EA, cujos valores estão na tabela 5 e 6.

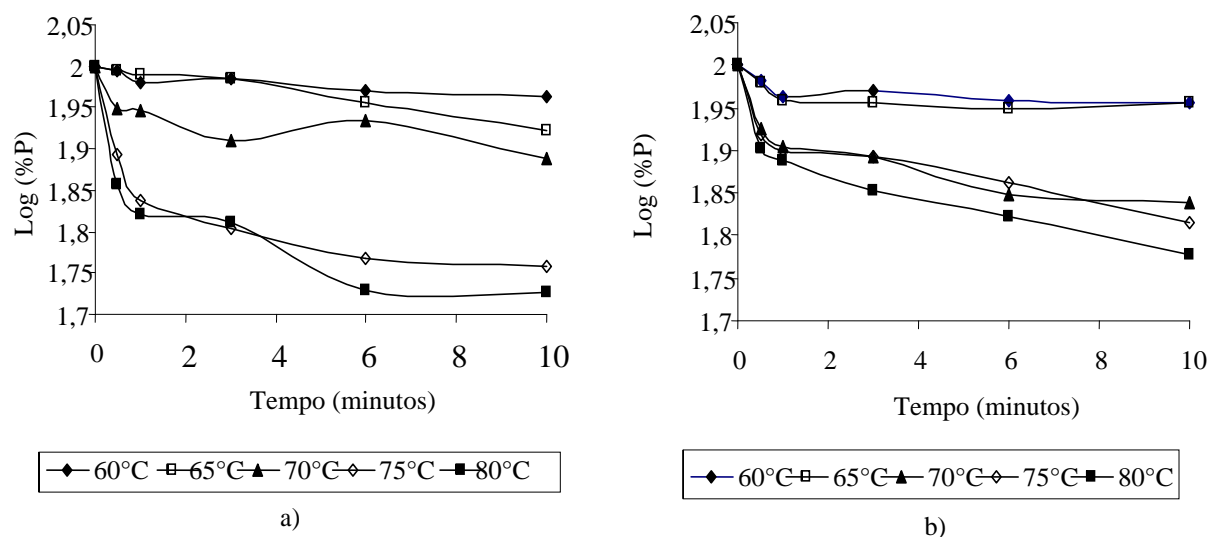


Figura 3 – Inativação térmica da PIN de polpa de abacate (Variedade Choquete) a 60, 65, 70, 75 e 80 °C. (a - Abacate Verde, b - Abacate Maduro).

Tabela 5 – Valores da Energia de Ativação das porções termolábil e termorresistente da PPO da polpa de abacate.

Variedade\Estádio de maturação	Enzima	Energia de Ativação (kcal/mol)	
		Porção Termolábil	Porção Termorresistente
Quintal Verde	PPO	22,82	22,82
Quintal Maduro	PPO	21,47	21,20
Fortuna Verde	PPO	14,63	15,07
Fortuna Maduro	PPO	11,25	11,19
Choquete Verde	PPO	22,98	22,71
Choquete Maduro	PPO	13,01	13,02

Tabela 6 – Valores da Energia de Ativação das porções termolábil e termorresistente da POD e PIN da polpa de abacate.

Variedade\Estádio de Maturação	Enzima	Energia de Ativação (kcal/mol)	
		Porção Termolábil	Porção Termorresistente
Choquete Verde	POD	8,13	8,13
	PIN	21,63	21,25
Choquete Maduro	POD	13,02	12,97
	PIN	23,03	22,98

Os valores de energia de ativação encontrados para as porções termolábil e termorresistente da polifenoloxidase e peroxidase, fração solúvel e ionicamente ligada, estão entre 10–23 kcal/mol e 8–25 kcal/mol, respectivamente. Segundo Sgarbieri (1996) os valores de energia de ativação para a destruição de enzimas estão entre 12-100 kcal/mol. A energia

de ativação para a desnaturação de enzima apresenta uma grande variação (12-100 kcal/mol), indicando a presença de isoenzimas de variável resistência térmica. Logo, a energia de ativação nas temperaturas estudadas está dentro da faixa 12–100Kcal/mol reportada para o processo de inativação térmica de enzimas.

CONCLUSÃO

Nas condições do experimento, dentre as variedades estudadas, a variedade que apresentou menor atividade enzimática na polpa foi a Fortuna, o que a destacaria entre as outras para um processo de industrialização.

AGRADECIMENTOS

Ao Engenheiro Agrônomo Sabino Leonides Moteka pelo fornecimento dos frutos da Fazenda Experimental do Campus Regional de Diamante do Norte/UEM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, J. M. A. **Química dos alimentos**. Viçosa: UFV, 1999.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química dos alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1992.
- CLEMENTE, E. Purification and thermo stability of isoperoxidase from oranges. **Phytochemistry**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 29-36, 1998.
- EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.
- FORTUNATO, A. A. **Estudo da cinética de inativação da pectinesterase e da peroxidase presentes na polpa de cajá (*Spondias lútea*)**. 2002. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2002.
- FUJITA, S.; SAARI, N.; MAEGAWA, M.; TETSUKA, T.; HAYASHI, N.; TONO, T. Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea L.*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 1138-1142, 1995.
- LING, A. C.; LUND, D. B. Determining kinetics parameters for thermal inactivation of heat resistant and heat labile isoenzymes from thermal destruction curves. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 43, p. 1307-1310, 1978.
- LUND, D. B. Heat processing. In: _____. **Principles of food science: part II: principles of food preservation**. New York: M. Dekker, 1975.
- RAMASWAMAMY, H. S.; VOORT, F. R. van de; GHAZALA, S. An analysis of TDT and arrhenius methods for handling process and kinetic data. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 54, p. 1322-1326, 1989.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, 1996.