




UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos  
Departamento de Engenharia de Alimentos


**ZEA – 0561 – BIOQUÍMICA DE ALIMENTOS**



**Aula 04 –  
Oxidoredutases –  
ESCURECIMENTO  
ENZIMÁTICO**

1S2019

Profa. Marta Mitsui Kushida



**Dica:**

**Capítulo 10** do livro  
"QUÍMICA DE ALIMENTOS"  
de Júlio Araújo  
e  
**Capítulo 5** do livro  
"BIOQUÍMICA DE  
ALIMENTOS" de M. G. Koblitz  
das referências!!!!

Não se esqueçam que  
existem outras  
referências, que  
podem complementar  
seus estudos.

Procurem!!!!

**Artigo:** Marshall, M. R.; Kim, J.; Wei, C. I.  
Enzymatic browning in fruits,  
vegetables and seafoods. Disponível em: <  
<http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMEFINAL/Enzymatic%20Browning.html>>.

**POLIFENOLOXIDASE (PFO)**

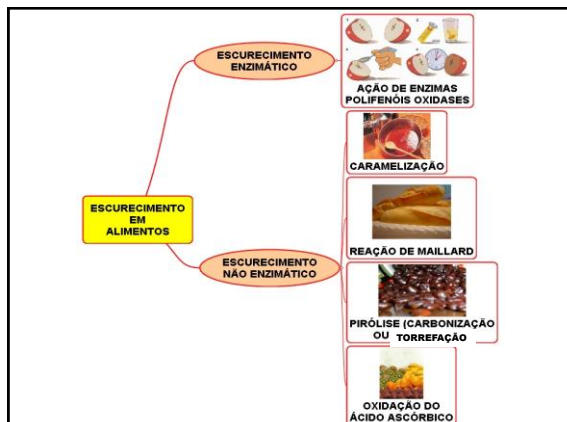
**Polifenol Oxidase**

- EC. 1.14.18.1 =
  - monofenol monooxigenase (tirosinase, fenolase, monofenol oxidase e creolase).
- E.C. 1.10.3.1 =
  - catecol oxidase (difenol oxidase, fenolase, polifenoloxidase)

**Polifenol oxidase**

- Oxidação de compostos fenólicos
- Formação de pigmentos escuros
- Presente em frutas e hortaliças

**COMPOSTOS ENVOLVIDOS  
NAS REAÇÕES DE  
ESCURECIMENTO  
ENZIMÁTICO E NÃO  
ENZIMÁTICO**

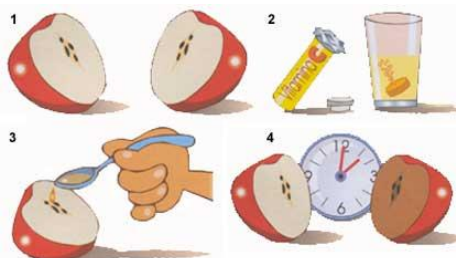


## REAÇÕES DE ESCURECIMENTO EM ALIMENTOS

Tipo de reação	O <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	carboidrato	Pigmento formado
Maillard	-	+	+	melanoidina
Caramelização	-	-	+	caramelo
Oxidação da vitamina C	+	-	-	melanoidina
Escurecimento enzimático	+	-	-	melanina

(+) presença (-) ausência

## ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO



## ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO

Causado pela oxidação de substâncias presentes naturalmente em vegetais por meio de enzimas também presentes naturalmente, formando pigmentos escuros!

## ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO

- A polifenoloxidase (PPO),
  - Frutas e hortaliças,
  - Responsável pelo escurecimento enzimático durante o manuseio pós-colheita e a industrialização.
- Inibir e controlar
  - atuação sobre a enzima e/ou substratos da reação, visando manter a qualidade sensorial e nutricional dos produtos.

## Você sabia?



50% da perda de frutas tropicais no mundo é resultante da ação da PPO?

## Você também sabia?

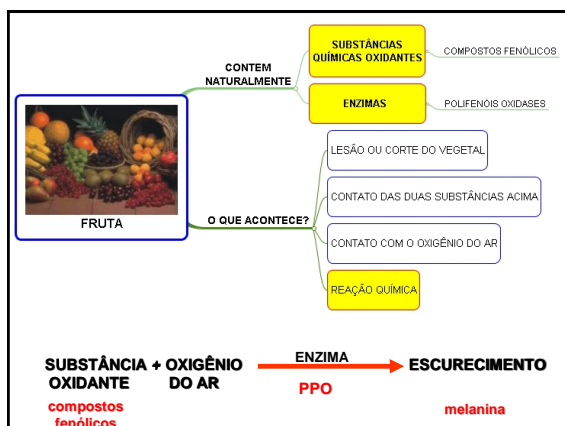


A ação da PPO também acontece em frutos do mar (ex. camarão), levando ao escurecimento?

## TIPOS DE ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO EM FRUTAS

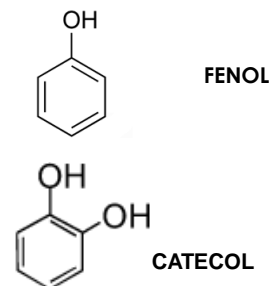
- Funcional
  - Ocorre durante o desenvolvimento do vegetal
- Acidental
  - Resultante de avaria nas células

## ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO o que ocorre?



## COMPONENTES IMPRESCINDÍVEIS PARA QUE A REAÇÃO DE ESCURECIMENTO OCORRA

- Enzima
- Substrato fenólico
- Oxigênio



## A ENZIMA ENVOLVIDA:

## POLIFENOLOXIDASE (PPO)

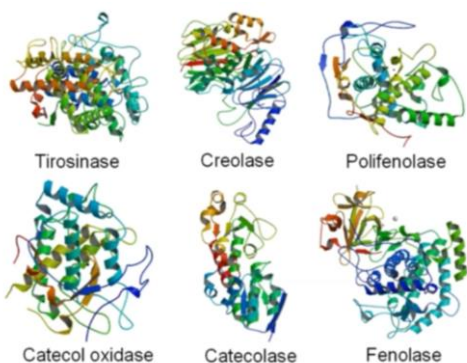
## OUTRAS DENOMINAÇÕES DA PPO

- Tirosinase
- Polifenolase
- Fenolase
- Catecol oxidase
- Catecolase
- Cresolase
- o-difenol oxidase
- Monofenol oxidase

Porque?

= 2 tipos de substratos!

- 1) Substrato Monohidroxifenol = hidroxila a o-posição = EC 1.14.18.1 [monofenol oxidase]
- 2) Substrato o-dihidroxifenol = oxidação para remoção de hidrogênio dos grupos hidroxilas, formando benzoquinonas = EC 1.10.3.1 [o-difenol oxidase]



## PROPRIEDADES DA PPO

- pH ótimo
  - 6 - 7
  - inativação (pH ≤ 4)
- Termo sensível
- Possui Cu<sup>++</sup> no centro ativo

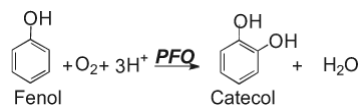
## PPO

- Encontrada praticamente em todos os tecidos vegetais
- Presente em alguns microrganismos e fungos filamentosos
- Presente em insetos e crustáceos
- Altas concentrações  
cogumelo, batata, pêssigo, café, maçã, banana, camarão

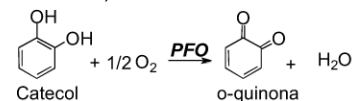
## A ENZIMA ENVOLVIDA

- catalisa a oxidação de:

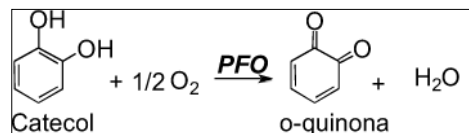
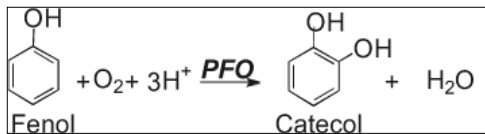
**monofenóis** (e.g. tirosina, fenol, p-cresol)



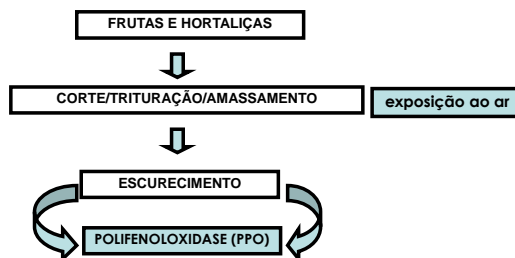
**difenóis** (e.g. catecol, L-dopa, dopamina, adrenalina)



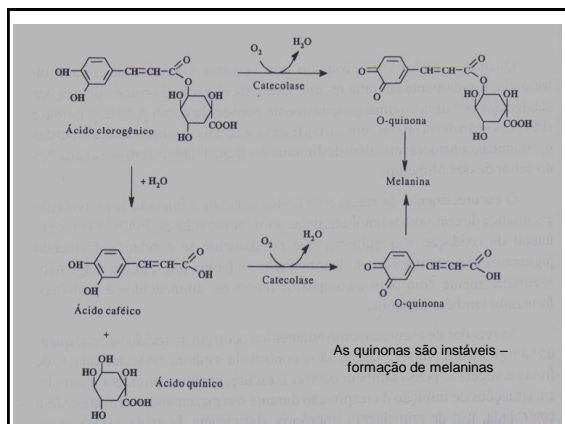
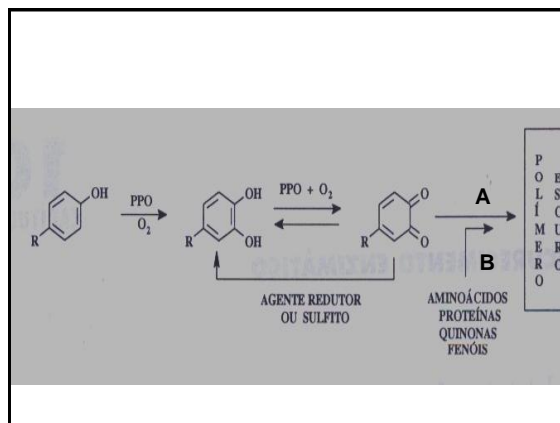
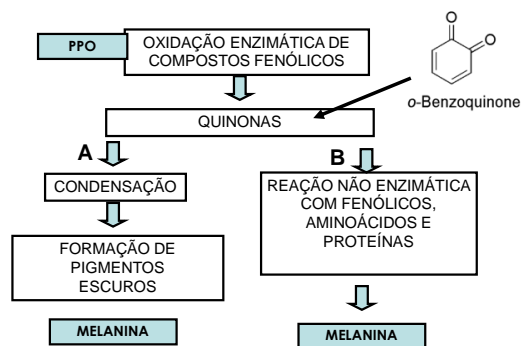
**Novamente para fixar!!!!**



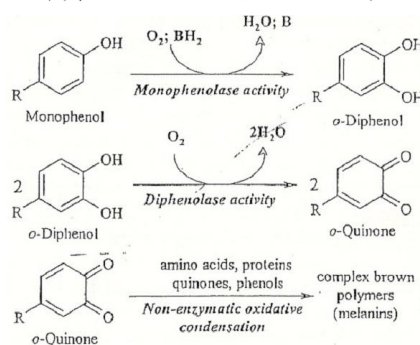
**REAÇÕES DE ESCURECIMENTO**



**REAÇÕES DE ESCURECIMENTO**



Reações catalisadas pela PPO e formação de compostos escuros (melaninas). (reproduzido de TOIVONEN; BRUMMELL, 2008).



## Você sabia?

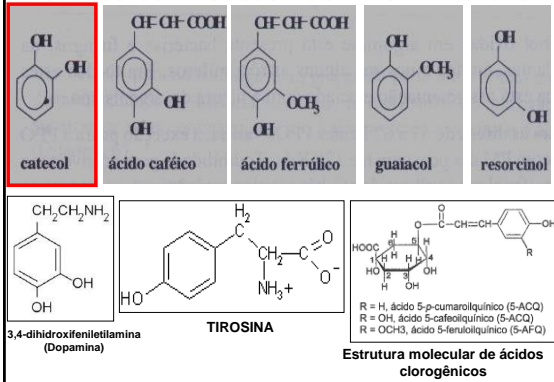


Uma monofenol oxidase pode atuar como o-difenol oxidase, porém nem todas o-difenol oxidase podem atuar como uma monofenol oxidase?

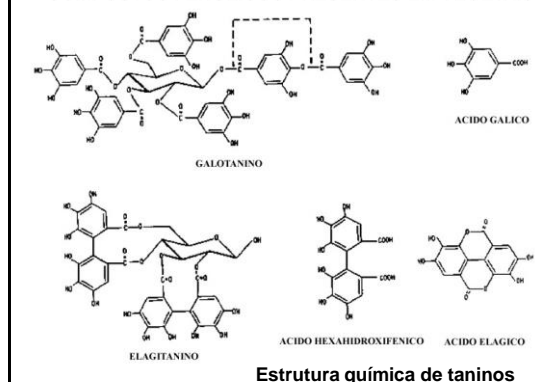
## COMPOSTOS NATURAIS MAIS SUSCETÍVEIS À REAÇÃO

- Incluem:
  - ANTOCIANINAS;
  - CATEQUINAS (catecol);
  - FLAVONÓIDES (antocianidinas, flavonas, flavonóis).
  - TIROSINA;
  - ÁCIDOS CLOGRÊNICOS, CAFÉICO, GÁLICO
  - HIDROQUINONA
- Também associados à adstringência de frutas tropicais (caju, banana) – ex. Taninos.

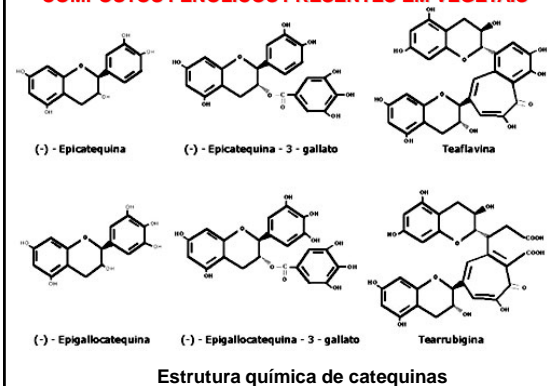
### COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM VEGETAIS



### COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM VEGETAIS



### COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM VEGETAIS



### SUBSTRATOS ENDÓGENOS PARA PPO

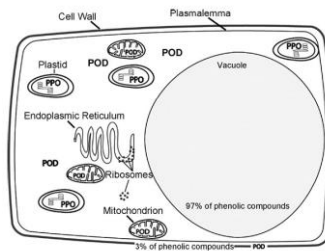
PRODUTO	SUBSTRATO
Banana	3,4-dihidrofeniletilamina (Dopamina), leucocianidina
Maçã	Ácido clorogênico, O-catequina, catecol,
Cacau	Catequinas, leucoantocianidinas, anthocianinas, complexos taninos
Café	Ácido clorogênico, Ácido caféico
Berinjela	Ácido caféico, Ácido cinâmico
Alface	Tirosina, ácido caféico, derivados de ácidos clorogênicos
Cogumelo	Tirosina, catecol, Dopamina
Batata	Tirosina, Ácido clorogênico, Flavonóides, catecol, <i>p</i> -cresol
Chá	Flavonóides, catequinas, taninos
Pêssego	Taninos, catecol, ácido caféico, catequina
Pêra	Ácido clorogênico, catecol, catequina, ácido caféico

## NAS CÉLULAS...

- Concentração (atividade) depende
  - do local do plantio,
  - período da colheita,
  - espécie e
  - do estado de amadurecimento (menor em frutos ou vegetais não maduros).

## NAS CÉLULAS...

Localização interna e externa de compostos fenólicos e das enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) em uma célula vegetal. (reproduzido de TOIVONEN; BRUMMELL, 2008).



Dos Santos, I. R. C., 2009

## Função Biológica da PPO

- Tem papel na cadeia respiratória das plantas superiores;
- Importantes na defesa vegetal
  - A polimerização oxidativa de quinonas para melaninas insolúveis em cima dos ferimentos, sela os tecidos infectados;
  - podem formar complexos com proteínas que atuam como uma barreira física
  - Efeitos bactericidas e fungicidas de hidroxifenóis e quinonas;
  - efeitos tóxicos dos fenólicos polimerizados nos vírus de tecidos injuriados;

## MELANINAS

- Polímeros amorfos
- Insolúveis
- Frequentemente ligados a proteínas
- Altamente estáveis

Pigmentos marrons, sendo que sua coloração é mais escura quanto maior for sua massa molecular.

## Métodos de detecção da atividade

- Espectrofotômetro a 238nm

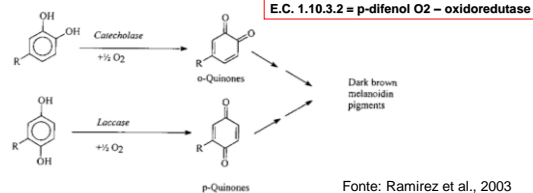


## Você sabia?

Um terceiro tipo de reação de escurecimento ocorre com a enzima **LACASE** (Benzenodiol:oxigenio oxireductase – EC 1.10.3.2) atuando sobre compostos p-hidroxi?



Mas isto é outra história...



Fonte: Ramirez et al., 2003

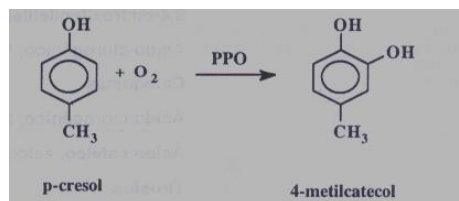
## MECANISMO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA

### MECANISMO DA AÇÃO ENZIMÁTICA

#### reação 1

##### ■ Monoxigenase

Hidroxilação de monofenol para diidroxiifenol

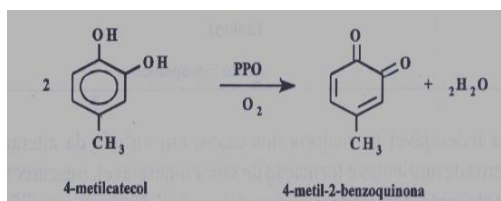


### MECANISMO DA AÇÃO ENZIMÁTICA

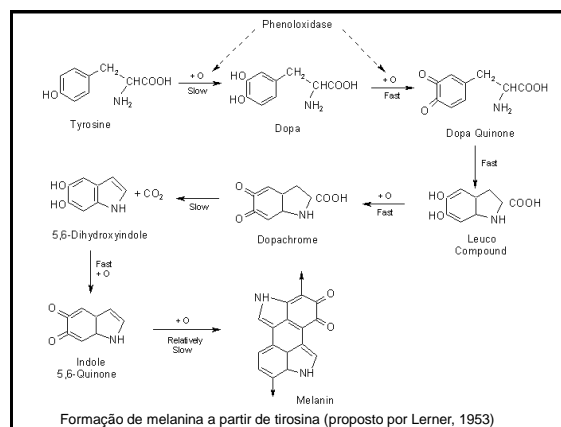
#### reação 2

##### ■ Oxidase

Oxidação de difenol para o-quinona



As reações subsequentes ocorrem espontaneamente (sem enzima e sem O<sub>2</sub>).



### CONSEQUÊNCIAS DA AÇÃO ENZIMÁTICA

- Alteração na aparência
  - formação de pigmentos escuros
- Alterações no sabor, aroma, odor e valor nutricional
- Redução da vida útil
- Diminuição do valor de mercado do alimento



(CHITARRA; CHITARRA, 2005).



## ALTERAÇÕES INDESEJÁVEIS



corte fresco (a)



corte escurecido (b)

## ALTERAÇÕES INDESEJÁVEIS



corte fresco (a)



corte escurecido (b)

## Crustáceos

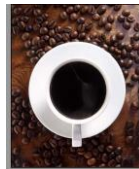
- PFO – importante no restabelecimento de feridas – função antibactericida e antifúngica!
- Catalisam o escurecimento do produto.



## ALTERAÇÕES DESEJÁVEIS



Indispensável na fabricação do chá preto:  
Chá verde = catequinas



Responsável pela formação da cor característica em amêndoas de cacau

## CONTROLE DO ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO

Métodos Químicos

Métodos Físicos

Métodos Combinados

## MÉTODOS DE CONTROLE

1. Exclusão ou restrição ao oxigênio
2. Uso de agentes quelantes
3. Aplicação de calor – inativação térmica da enzima
4. Redução do pH – Ácidos orgânicos
  - adição de ácido cítrico
5. Adição de substâncias redutoras
  - ácido ascórbico, sulfito, tióis

## 1. EXCLUSÃO DO OXIGÊNIO



Remoção do oxigênio do interior dos tecidos vácuo



Injeção de nitrogênio



Atmosfera modificada



Utilização de embalagens com baixa TPO<sub>2</sub> (Taxa de penetração de oxigênio)

## 2. Uso de agentes quelantes

- Desde que o grupo prostético da PPO é o cobre, o uso de agentes quelantes podem removê-lo e inativar a enzima.



## 3. APLICAÇÃO DE CALOR

- Principal método de controle
- Promove a inativação enzimática

**branqueamento**

**pasteurização**

## APLICAÇÃO DE CALOR

- Pré-tratamento de hortaliças destinadas ao enlatamento, congelamento e desidratação
- Produção de sucos e purês de frutas
- Controle rigoroso do binômio **tempo x temperatura**

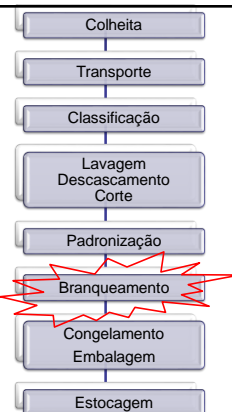
## Para que serve o branqueamento?

- Inativação de enzimas
- Eliminação de gases oclusos no tecido vegetal
- Redução de microrganismos
- Aquisição de textura e cor
- Desenvolvimento de sabor
- Pré-aquecimento
- Descascamento

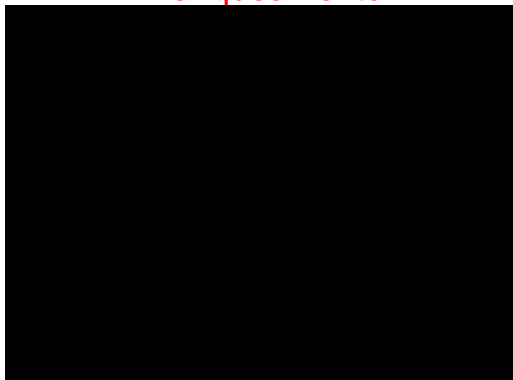
## BRANQUEAMENTO

- Uma das mais importantes **operações unitárias** que precedem outras técnicas (embalagem, congelamento, desidratação).
- Associado com a inativação enzimática = prevenção de alterações na qualidade durante estocagem prolongada
- Com água quente:
  - Normalmente entre 75 e 95°C entre 1 e 10 min (dependendo do tamanho individual do vegetal.
  - Tratamentos mais comuns (Holdsworth, 1983). : 95°C por
    - 2–3 min para grãos verdes e brócolis,
    - 4–5 min para couve de bruxelas,
    - 1–2 min para peras

Exemplo:  
Fluxograma de  
preparação de  
vegetais  
congelados

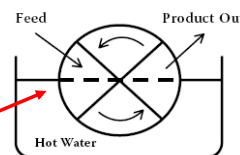


## Branqueamento



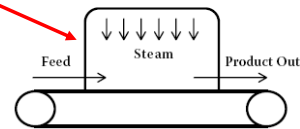
Dois métodos  
mais comuns:

- EXPOSIÇÃO A  
ÁGUA QUENTE  
OU AO VAPOR



(a) Branqueador rotativo (água)

TEMPO  
X  
TEMPERATURA



(b) Branqueador com vapor

Fonte: Gökmen, 2010, in: Bayındırlı, 2010.

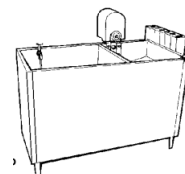
## Branqueador em escala doméstica



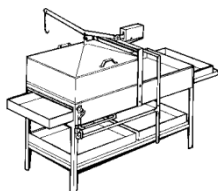
## Branqueador de cestas



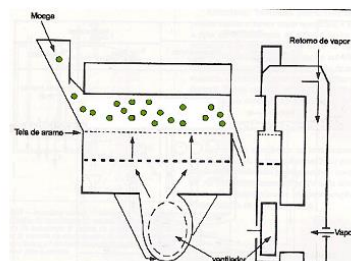
cestas para branqueamento



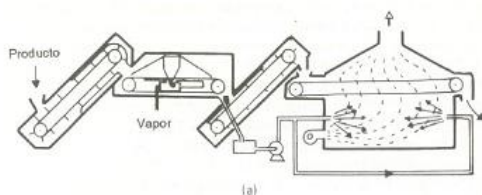
## Branqueador de bandejas (Tray-type steam blancher)



## Branqueador de leiteo fluidizado contínuo



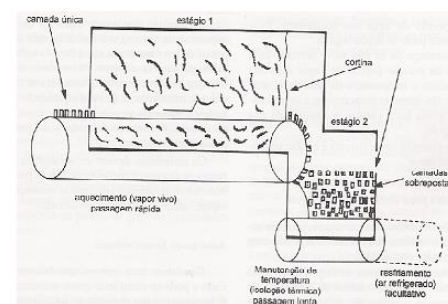
## BRANQUEADOR TIPO IQB (Individual Quick Blanching): branqueamento com vapor, resfriamento com água fria ou ar frio



□ Possibilita o branqueamento rápido de unidades em conjunto.

□ É constituído por uma seção de aquecimento ou câmara de vapor, onde apenas uma camada do produto, sobre uma esteira, passa de cada vez.

## Branqueador IQB (individual quick blanching)



## Branqueador de esteira



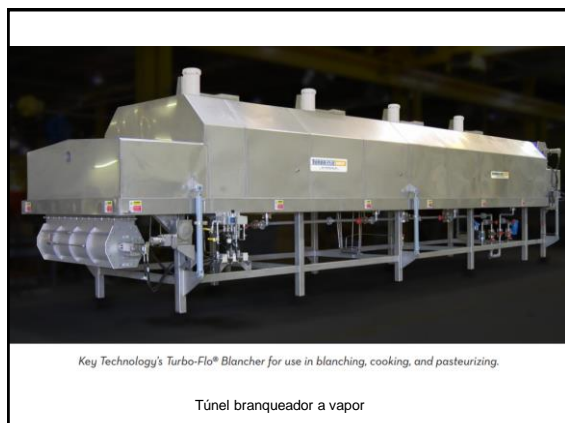
## Branqueador de esteira (vapor)



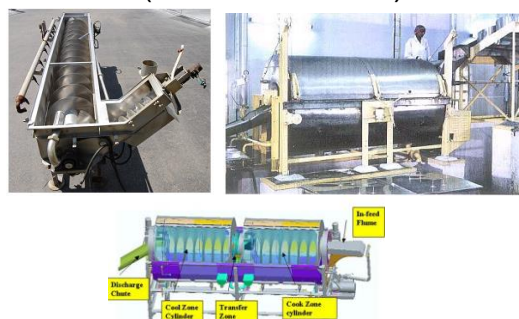
## Branqueador de esteira (imersão)



## Branqueador de câmaras



## Branqueador tipo parafuso (Screw Blancher)



## BRANQUEAMENTO

- A seleção de uma enzima como um indicador da eficiência do processo de branqueamento é crítico para o sucesso da operação!

### Seleção de uma enzima indicadora da eficiência do branqueamento (Velasco et al., 1989)

1. A perda da atividade enzimática precisa estar correlacionada com a retenção da qualidade de vegetais durante a estocagem;
2. A atividade da enzima precisa ser **facilmente determinada** na planta de processamento.
3. A inativação da enzima precisa ser **irreversível**. A atividade não pode ser recuperada durante os processos subsequentes;
4. É vantajoso que a mesma enzima possa ser utilizada como um indicador para outros vegetais.

## CATALASE E PEROXIDASE

- Utilizadas como indicadores da eficiência do branqueamento de vegetais.

Relativamente resistentes ao calor! Porém...

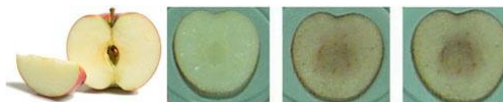
Em 1975 = U.S. Department of Agriculture – inativação da catalase não é indicador satisfatório (USDA, 1975).

PEROXIDASE = enzima mais termoresistente em vegetais.

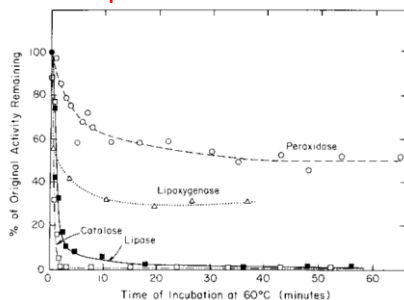
## inativação

Aplicações de temperaturas de 90 a 100°C/3min;

Presença de NaCl e pH ácido auxiliam no processo

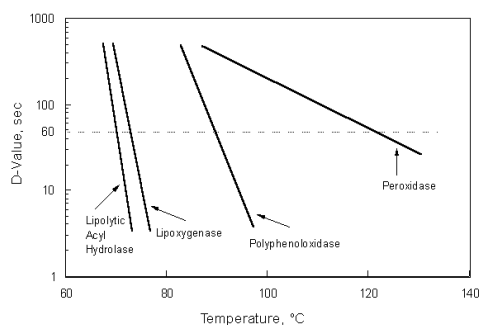


### Taxa de inativação de peroxidase, lipoxigenase, catalase e lipase em ervilhas incubadas a 60°C

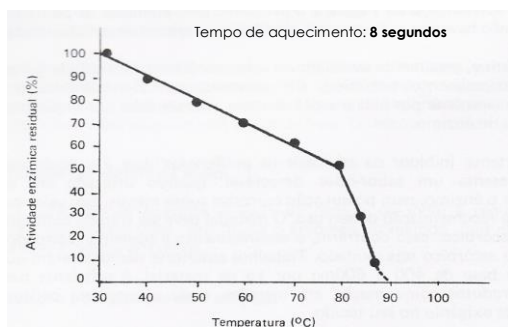


DC Williams, MH Lim, AO Chen, RM Pangborn, JR Whitaker. Blanching of vegetables for freezing: which indicator enzyme to choose. Food Technol 40:130-140, 1986.

### Inativação térmica de fração termoestável de Batata (Svensson, 1977)



### EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA PPO EM POLPA DE PÊRA



## 4. REDUÇÃO DO pH

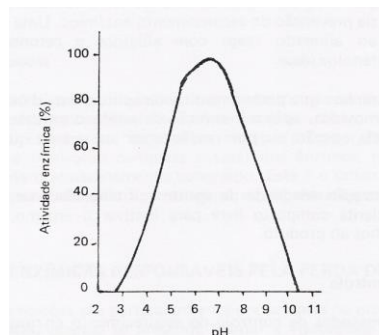
## APLICAÇÃO DE ÁCIDOS

Também oxida  
histidina sítio ativo

Também  
quelantes

- Ascórbico, fosfórico, cítrico e málico
- Redução da taxa de escurecimento enzimático pelo abaixamento do pH

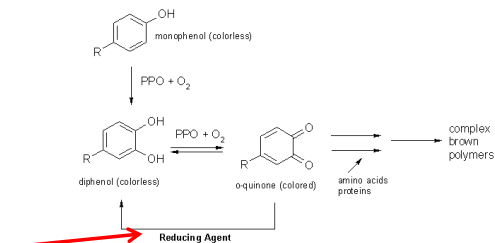
## EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA PPO



## 5. ADIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REDUTORAS

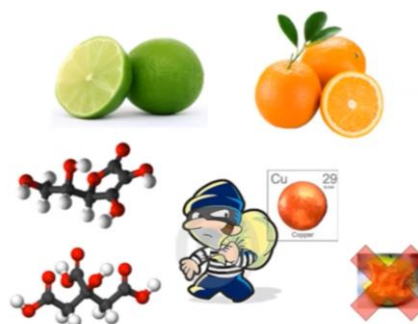
### ADIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REDUTORAS

- Ácido Ascórbico, Sulfito, Tióis.
  - Redução de O-benzoquinona de volta para a forma o-diidroxifenol
  - Inativação da PPO.



### a) Ácido ascórbico

- Reconhecido por sua ação redutora e contribuição nutricional (vitamina C).
- São os principais antioxidantes para uso em frutas e hortaliças e seus sucos, visando prevenir escurecimento e outras reações oxidativas.



## b) AGENTES SULFITANTES

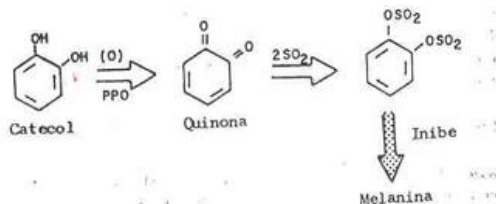
- Amplamente utilizados
- Substitui a aplicação do calor quando este resulta em alterações sensoriais indesejáveis
- Propriedade antimicrobiana
- Retenção da vitamina C
- Aplicações
  - batata frita congelada, palmito, água de coco, etc

## AGENTES SULFITANTES

- Dióxido de enxofre (sulfito), bissulfito de sódio, metabissulfito de sódio ou potássio.
- Poderosos inibidores de PPO (gás ou solução) 10mg/Kg de SO<sub>2</sub> livre
- Prática industrial  
imersão em solução  
(200 a 500mg de SO<sub>2</sub>/kg de água)

## Forma de ação do sulfito

- Pode complexar com o Cu<sup>++</sup>
- Pode se ligar a quinona:



## SO<sub>2</sub>

- Alta eficiência = rápida penetração.
- Difícil manuseio na planta industrial.
- Baixo custo;
- Apresentam atividade antimicrobiana.

## DESVANTAGENS DO USO DO SULFITO

- Prejudicial a indivíduos asmáticos
- Pode resultar em sabor desagradável
- Alteração da cor natural do alimento
- Destruição da vitamina B<sub>1</sub>
- Corrosão de embalagens metálicas
- Tóxico em níveis elevados

## ALTERNATIVAS PARA O USO DO SULFITO

- Eritorbatos  
Agentes redutores  
Estereoisômeros do ácido ascórbico  
Frutas *in natura*, processadas e congeladas, sucos, cerveja, vinho, etc
- Ácidos  
Cítrico, fumárico, tartárico, acético, fosfórico, ascórbico  
Frutas fatiadas



## ALTERNATIVAS PARA O USO DO SULFITO

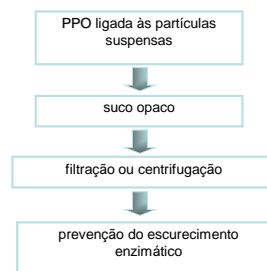
- Agentes complexantes
  - EDTA, fosfatos, ácido cítrico
  - Complexam com o cobre no centro ativo da enzima
    - Ação limitada
- Antioxidante
  - Ácido ascórbico (Sucos e enlatados de frutas)
  - Reduz O-quinona de volta a compostos fenólicos.
- Açúcar
  - Exclusão parcial do oxigênio dos tecidos
  - Frutas descascadas e fatiadas

## OUTROS MÉTODOS DE CONTROLE

## OUTROS MÉTODOS DE CONTROLE

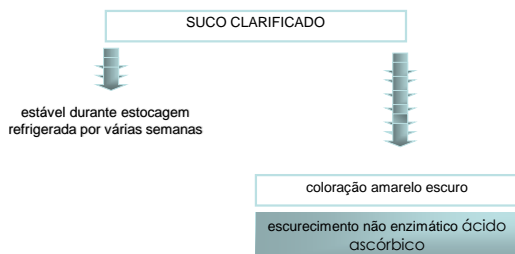
- Exclusão do substrato
  - adição de ciclodextrinas em sucos
- Metilação enzimática do substrato
- Água carbonatada
- Clarificação de sucos
  - Prevenção do escurecimento de sucos *in natura*

## PPO EM SUCOS



100

## PPO EM SUCOS



101

## METILAÇÃO DOS SUBSTRATOS FENÓLICOS

- Transformação química de substratos fenólicos
- Formação de compostos incompatíveis com a PPO
- Método de difícil aplicação prática

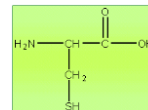
## INIBIÇÃO POR CLORETO DE SÓDIO

- Aplicação limitada
- Concentração elevada de NaCl
- Formação de sabor estranho

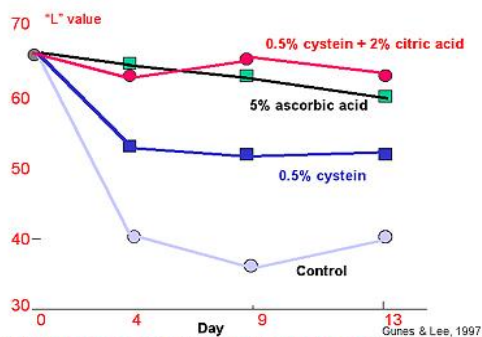
103

## AGENTES QUÍMICOS

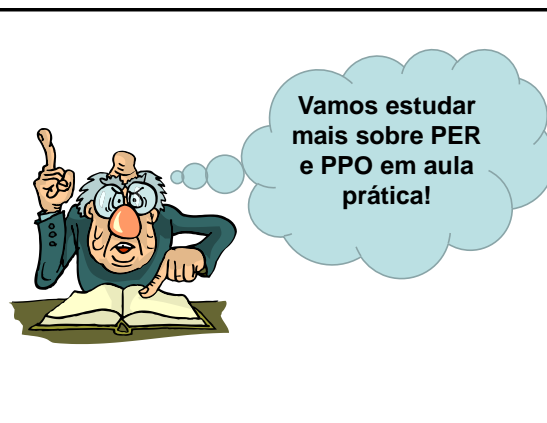
- Ácido ascórbico e seus derivados + ácido cítrico  
sucos
- Sulfito  
frutas e hortaliças, suco de uva, vinho
- Ácido cítrico  
alho
- L-cisteína  
banana e abacate



## EFEITO DE DIFERENTES TRATAMENTOS

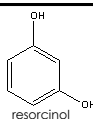


Dipping treatments on browning of packaged potato strips at 5°C



## INIBIÇÃO ENZIMÁTICA EM CARAMBOLA

4-hexilresorcinol (4-HR)



tratamento com 4-HR



sem tratamento

107

## INATIVAÇÃO TÉRMICA DA PPO EM SUCOS DE FRUTAS

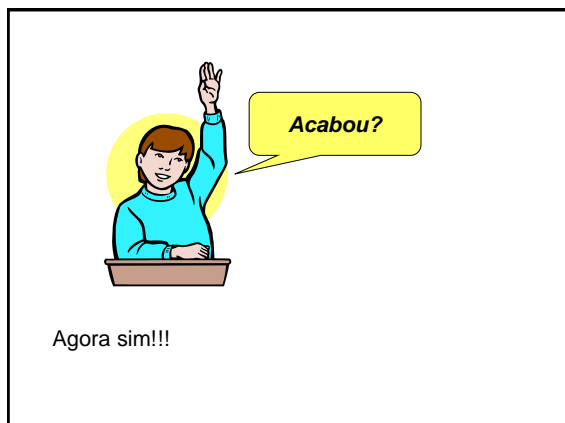
Fruta e tipo de suco	pH	Atividade enzimática	Tempo de inativação a 75°C (min)
<b>Pêssego</b>			
Suco turvo	4,03	3,78	3,41
Suco transparente	4,07	1,80	0,83
<b>Pêra</b>			
Suco turvo	4,40	5,42	6,0
Suco transparente	4,02	0,93	10,5
<b>Uva</b>			
Suco transparente	3,56	0,92	6,0
<b>Maçã</b>			
Suco turvo	3,40	1,80	14
Suco transparente	3,35	0,76	0,29

Principais (potenciais) aplicações das oxidoreductases em alimentos					
Enzima	Sabor	Textura	Aparência	Vida de prateleira	Valor nutricional
Lipoxigenases	Produção in-situ e in-vitro de (off)-flavour	Extensibilidade e força da massa farinha	branqueamento de farinha		Destruição de vitamina A
Alcool Oxidase e Dehidrogenases	Produção in-situ e in-vitro de flavour			Alcool oxidase mais catalase, remoção de O <sub>2</sub>	
Sulfidril Oxidases	Remoção do sabor de cozido em leite UHT	Aumento da força da farinha em combinação com Peroxidase			
Peroxidases	Produção in-vitro de flavour e retirada de amargor	Ligações cruzadas em biopolímeros	Auxiliar da Polifenoloxidase na formação de cor	Lactoperoxidase, agente antimicrobiano	
Polfenoloxidases	Retirada de amargor de café, cacau e oliva		(Des)coloração; produção in vitro de cor		
Carboidrato Oxidases		Aumento da força da farinha via H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			
Acido Ascorbico Oxidase			Caramelização	com catalase, remoção de oxigênio	Destruição de vitamina C
Xantina Oxidases				Agente antimicrobiano	
Superóxido dismutase					
Catalases				Remoção de excesso de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
Colesterol Oxidoreductases					Redução de colesterol

- Uma lista de enzimas comerciais utilizadas em processamento de alimentos pode ser encontrada nos sites:

– Enzyme Technical Association (<http://www.enzymetechnicalassoc.org> )

– Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products (<http://www.amfep.org>).



## Outras Referencias

- Gökmen, V. Selection of the Indicator Enzyme for Blanching of Vegetables. Chapter 5. in: **Enzymes in Fruit and Vegetable Processing - Chemistry and Engineering Applications**. BAYINDIRLI, A. (ed.), CRC Press, 2010. p. 123-144.
- Laane, C.; Bruggeman, Y.; Winkel, C. Applications of Oxidoreductases in Foods. Chapter 13. in: **Handbook of Food Enzymology**. Whitaker, J. R.; Voragen, A. G. J.; Wong, D. W. S. (eds.). Marcel Decker, 2003.
- Ramírez, E. C.; Whitaker, J. R.; Virador, V. M. Polyphenol Oxidase. Chapter 39. in: **Handbook of Food Enzymology**. Whitaker, J. R.; Voragen, A. G. J.; Wong, D. W. S. (eds.). Marcel Decker, 2003.
- Santos, I. R. C. Escurecimento enzimático em frutos: polifenoloxidase de atemóia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.). Dissertação: Mestrado – UNESP – Araraquara, 2009. 119 f.