

BIOQUÍMICA DE ALIMENTOS  
Aula Prática Nº 01 - LAN 200  
Prof. Severino Matias de Alencar  
Técnica: Regina H. Gonçalves

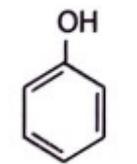
**AULA PRÁTICA SOBRE ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO (PFO)**

22 de novembro de 2023

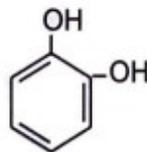
**FUNDAMENTO:**

A polifenoloxidase (1,2-benzenodiol:oxigênio oxidoredutase) é frequentemente denominada tirosinase, polifenoloxidase, fenolase, catecoloxidase, creolase ou catecolase, dependendo do substrato usado no ensaio ou encontrado em maior concentração na fruta ou vegetal. As polifenoloxidases são enzimas que possuem íons  $\text{Cu}^{2+}$ . A remoção dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  do sítio ativo inativa a enzima.

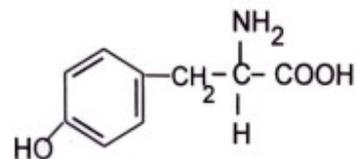
Substratos da Polifenoloxidase



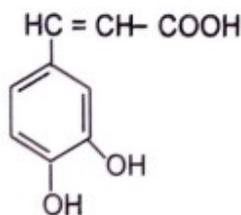
Monofenol



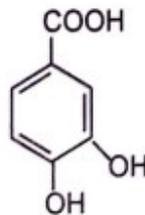
Catecol



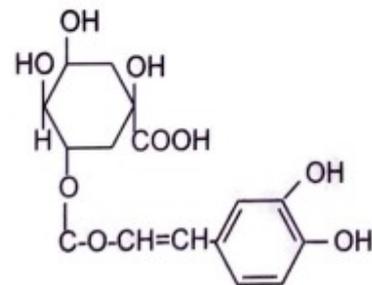
Tirosina



Ácido cafeico



Ácido Protocatechuico



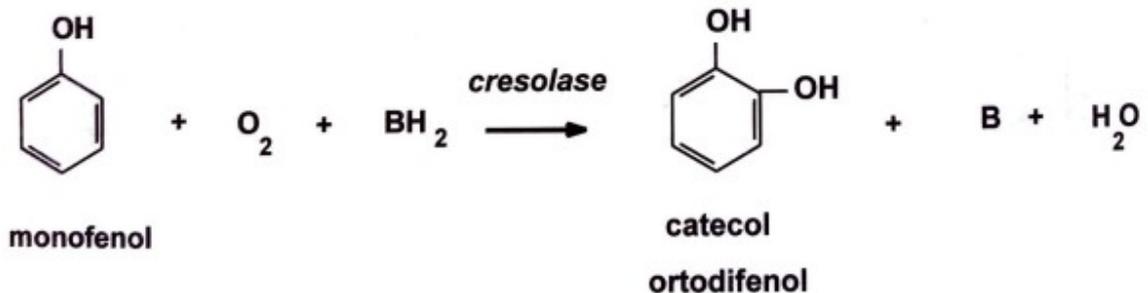
Ácido Clorogênico

O escurecimento enzimático devido a PFO é de importância comercial particularmente em tecidos vegetais. Estima-se que cerca de 50% de algumas frutas tropicais são perdidas devido ao escurecimento enzimático (Whitaker, 1994). Normalmente os substratos fenólicos naturais (ácido caféico, ácido protocatechuico, ácido clorogênico, etc) estão separados da PFO em tecidos intactos e o escurecimento não aparece.

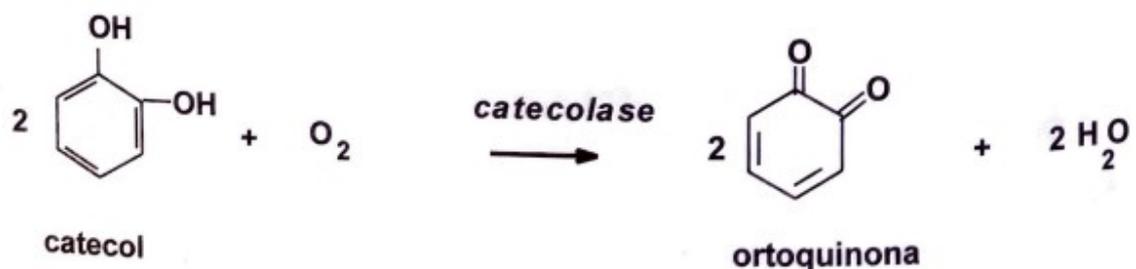
O escurecimento enzimático em tecidos vegetais ocorre devido a cortes ou injúria mecânica. A exposição da superfície de frutas e vegetais cortados ao ar resulta em rápido escurecimento devido à oxidação enzimática dos compostos fenólicos presentes para ortoquinonas que por sua vez polimerizam-se rapidamente para formar pigmentos marrons de melaninas. Na reação catalisada pela PFO o substrato fenólico é oxidado e o oxigênio serve como aceptor de hidrogênio. Assim operações como corte, descascamento, contusão são suficientes para causar escurecimento enzimático.

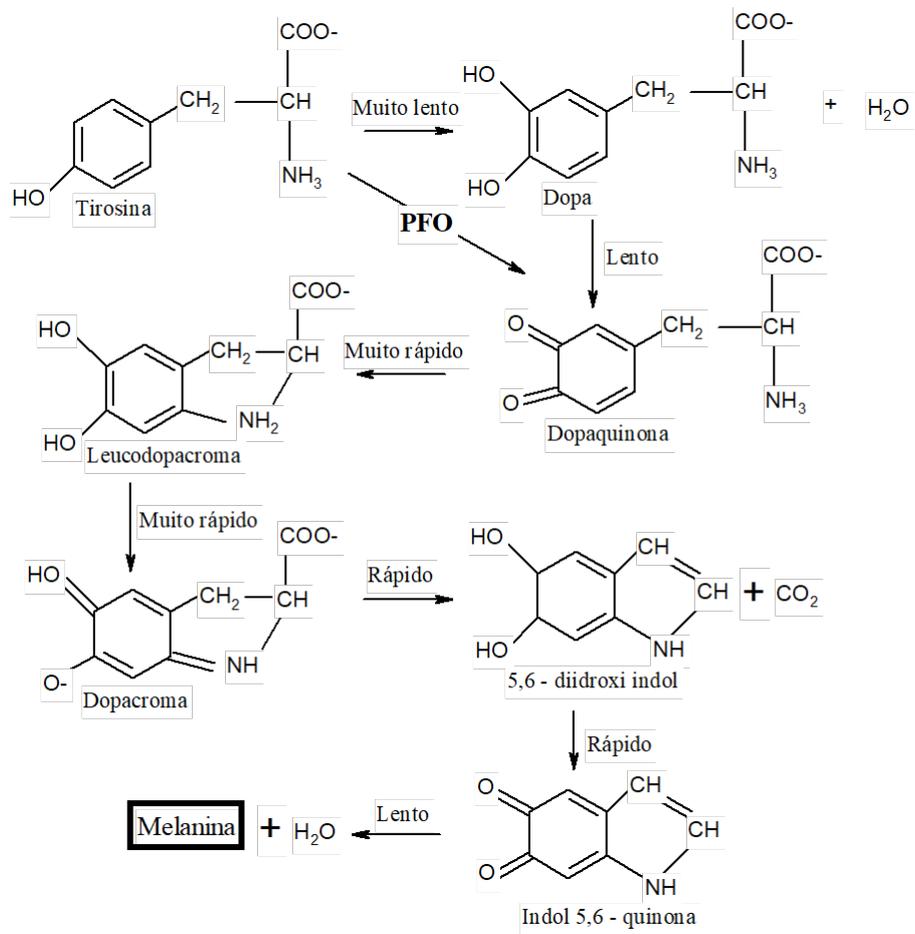
A polifenoloxidase catalisa dois tipos de reações:

- a) Hidroxilação de monofenóis para difenóis, conhecida como creolase, fenol hidrolase, monofenoloxidase ou tirosinase.



- b) Oxidação de difenóis para ortoquinona, conhecida como atividade de catecolase ou polifenoloxidase.





## OBJETIVO:

Estudar o efeito da temperatura e inibidores da atividade da polifenoloxidase em frutas e vegetais.

## PROCEDIMENTOS:

### **ITEM A: Inativação térmica da PFO: Aquecimento da fruta ou vegetal em água em ebulição por 5 minutos**

1 – Para a inativação térmica da PFO, descascar a fruta e/ou vegetal e cortar em cubos de 1cm de aresta;

2 – Pesar as amostras conforme indicado na tabela abaixo e colocar em uma panela contendo 300mL de água destilada em ebulição e deixar ferver por 5 minutos;

FRUTA / VEGETAL	GRUPOS	PESO (g)	VOLUME H <sub>2</sub> O (mL)
BATATA	1, 3 e 5	30	300
BANANA	1, 3 e 5	30	300
MAÇÃ	2, 4 e 6	60	300
BERINJELA	2, 4 e 6	30	300

3 – Após este tempo, coloca a panela em bacia água com gelo para resfriar;

4 – Homogeneizar a amostra (fruta + água) em liquidificador;

5 – Filtrar as amostras em algodão utilizando funil e recolher o filtrado;

6 – Utilizar a amostra como extrato enzimático de PFO obtido após tratamento térmico.

### **A.1: Testar a Inativação da polifenoloxidase:**

1 – Pipetar para tubos de ensaio, 4mL da solução de Catecol 0,2% em tampão fosfato 0,05M pH 6,0;

2 – Adicionar 0,5mL de água destilada;

3 – Adicionar em cada tubo 0,5mL do extrato de PFO obtido no **Item A (subitem 6)**;

4 – Incubar o tubo em banho-maria termostatizado à 40°C durante 30 minutos;

5 – Observar a coloração:

**Incolor = Inativa**

**Amarela = Ativa**

Inativação Térmica da PFO de frutas e vegetais através de tratamento térmico em água em ebulição por 5 minutos						
PFO	RESULTADOS					
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
PFO BATATA						
PFO BANANA						
PFO MAÇÃ						
PFO BERINJELA						

=====

**ITEM B: Efeito do ácido L-ascórbico, ácido cítrico, bissulfito de Sódio, cloreto de Sódio e ácido oxálico na atividade de polifenoloxidase de berinjela**

- 1 – Preparar soluções de: ácido L-ascórbico, ácido cítrico, bissulfito de sódio, cloreto de sódio e ácido oxálico, nas concentrações indicadas na tabela abaixo;
- 2 – Transferir 30mL de cada solução para placas de Petri devidamente identificadas;
- 3 – Descascar a berinjela e cortar em fatias de 0,7 cm de espessura;
- 4 – Colocar uma fatia em cada placa de Petri contendo 30mL da solução e amassar a berinjela com o auxílio de um garfo;
- 5 – Anotar a intensidade do escurecimento enzimático.

**Intensidade do Escurecimento: ++, +, ou –**

**Efeito do ácido L-ascórbico, ácido cítrico, bissulfito de Sódio, cloreto de sódio e ácido oxálico na atividade de polifenoloxidase de Berinjela**

<b>Grupo</b>	<b>Placa</b>	<b>Amostra</b>	<b>Escurecimento Enzimático</b>
<b>1</b>	1	Berinjela + 30 mL de água	
<b>1</b>	2	Berinjela + 30 mL de ácido L-Ascórbico 1,0%	
<b>2</b>	3	Berinjela + 30 mL de ácido L-Ascórbico 0,5%	
<b>2</b>	4	Berinjela + 30 mL de ácido Cítrico 1,0%	
<b>3</b>	5	Berinjela + 30 mL de ácido Cítrico 0,5%	
<b>3</b>	6	Berinjela + 30 mL de bissulfito de Sódio 0,5%	
<b>4</b>	7	Berinjela + 30 mL de bissulfito de Sódio 0,25%	
<b>4</b>	8	Berinjela + 30 mL de bissulfito de Sódio 0,1%	
<b>5</b>	9	Berinjela + 30 mL de bissulfito de Sódio 0,05%	
<b>5</b>	10	Berinjela + 30 mL de bissulfito de Sódio 0,02%	
<b>6</b>	11	Berinjela + 30 mL de cloreto de Sódio 1,0%	
<b>6</b>	12	Berinjela + 30 mL de ácido Oxálico 0,5%	

=====

**ITEM C: Extração da polifenoloxidase (PFO) ativa de frutas e vegetais**

1 – Descascar as frutas e/ou vegetais e cortar em pedaços pequenos;

2 – Pesar as amostras conforme indicado na tabela abaixo:

<b>FRUTA / VEGETAL</b>	<b>GRUPOS</b>	<b>PESO (g)</b>	<b>VOLUME H<sub>2</sub>O (mL)</b>
<b>BATATA</b>	<b>1, 3 e 5</b>	60	600
<b>BANANA</b>	<b>1, 3 e 5</b>	60	600
<b>MAÇÃ</b>	<b>2, 4 e 6</b>	120	600
<b>BERINJELA</b>	<b>2, 4 e 6</b>	60	600

3 – Transferir para copo de liquidificador a amostra e adicionar 600mL de água destilada a 10°C e homogeneizar;

- 4 – Homogeneizar a amostra (fruta + água) em liquidificador;
- 5 – Filtrar as amostras em algodão utilizando funil e recolher o filtrado;
- 6 – Utilizar o filtrado como **extrato enzimático de PFO**.

**Notas:**

**Filtrado = Extrato da Enzima Polifenoloxidase = PFO**

=====

**ITEM D: Efeito do pH na atividade de polifenoloxidase de frutas e vegetais**

- 1 – Pipetar para tubos de ensaio 8mL da solução de Catecol 0,2% em tampão de diferentes valores de pH, conforme indicado na tabela abaixo, para tubos de ensaio previamente numerados;
- 2 - Adicionar 0,5mL de água destilada em cada tubo de ensaio;
- 3 – Adicionar em cada tubo 0,5mL de extrato de PFO obtido no **Item C (Subitem 6)**;
- 4 – Anotar a intensidade da coloração amarela após 10 minutos da reação.

**Intensidade da Coloração: -, +, ++, +++ ou ++++**

- 5 – Identificar o pH ótimo de atividade e comparar os resultados obtidos com os valores descritos na literatura.

Efeito do pH na atividade de polifenoloxidase de frutas e vegetais				
pH	Grupos 1, 3 e 5 PFO BATATA	Grupos 1, 3 e 5 PFO BANANA	Grupos 2, 4 e 6 PFO MAÇÃ	Grupos 2, 4 e 6 PFO BERINJELA
3,6				
4,0				
5,0				
6,0				
7,0				

=====

**ITEM E: Efeito do ácido L-ascórbico na atividade de polifenoloxidase de frutas e vegetais**

1 – Pipetar 4mL de solução de Catecol 0,2% em tampão fosfato 0,05M pH 6,0 em 5 tubos de ensaio previamente numerados;

2 – Adicionar em cada tubo 0,5mL de solução de ácido L-ascórbico nas concentrações: 0,02%, 0,05%, 0,10%, 0,25% e 0,50%;

3 – Adicionar em cada tubo 0,5mL de extrato de PFO obtido no **Item C (subitem 6)**;

4 – Anotar a intensidade da coloração após 10 ou 15 minutos da reação. Anotar em que concentração de inibidor não ocorreu escurecimento enzimático;

**Intensidade da Coloração: -, +, ++, +++ ou ++++**

5 – Verificar na literatura a concentração máxima de ácido L-Ascórbico que pode ser utilizado em frutas e vegetais.

Efeito do ácido L-ascórbico na atividade de polifenoloxidase de frutas e vegetais				
Ácido L-ascórbico	Grupos 1, 3 e 5 PFO BATATA	Grupos 1, 3 e 5 PFO BANANA	Grupos 2, 4 e 6 PFO MAÇÃ	Grupos 2, 4 e 6 PFO BERINJELA
0,02%				
0,05%				
0,10%				
0,25%				
0,50%				

=====

**ITEM F: Efeito do bissulfito de Sódio na atividade de polifenoloxidase de frutas e vegetais**

1 – Pipetar 4mL de solução de Catecol 0,2% em tampão fosfato 0,05M pH 6,0 em 5 tubos de ensaio previamente numerados;

2 – Adicionar em cada tubo 0,5mL de solução de bissulfito de Sódio nas concentrações: 0,02%, 0,05%, 0,10%, 0,25% e 0,50%;

3 – Adicionar em cada tubo 0,5mL de extrato de PFO obtido no **Item C (subitem 6)**;

4 – Anotar a intensidade da coloração após 10 ou 15 minutos da reação. Anotar em que concentração e inibidor não ocorreu escurecimento enzimático;

**Intensidade da Coloração: -, +, ++, +++ ou ++++**

5 – Verificar na literatura a concentração máxima de bissulfito de Sódio que pode ser utilizado em frutas e vegetais.

Efeito do bissulfito de Sódio na atividade de polifenoloxidase de frutas e vegetais				
Bissulfito de Sódio	Grupos 1, 3 e 5 PFO BATATA	Grupos 1, 3 e 5 PFO BANANA	Grupos 2, 4 e 6 PFO MAÇÃ	Grupos 2, 4 e 6 PFO BERINJELA
0,02%				
0,05%				
0,10%				
0,25%				
0,50%				

=====

### **ITEM G: Inativação térmica da polifenoloxidase na presença de bissulfito de Sódio**

1 – Preparar tubos de ensaio com diferentes quantidades de bissulfito de Sódio de acordo com a tabela abaixo:

**Tabela 1**

<b>Inativação térmica da polifenoloxidase na presença de bissulfito de Sódio</b>			
Tubo	Bissulfito de Sódio 0,05% (mL)	Água Destilada (mL)	Extrato de PFO (mL)
Controle	0	5	5
1	5	4	5
2	1	4	5

- 2 – Incubar os 9 tubos de ensaio nas temperaturas indicadas na tabela abaixo;
- 3 – Retirar a cada 5 minutos um tubo de cada concentração de bissulfito de Sódio e levar para banho de gelo;
- 4 – Repetir este procedimento durante os primeiros 15 minutos
- 5 – Testar a atividade residual de PFO como descrito a seguir:

### **Tratamento Térmico dos Extratos Enzimáticos de Frutas e Vegetais**

Tratamento Térmico dos Extratos Enzimáticos de Frutas e Vegetais		
Nº Grupo	Tratamento Térmico	Amostra
1	55°C	Extrato de Batata
1	55°C	Extrato de Banana
2	55°C	Extrato de Maçã
2	55°C	Extrato de Berinjela
3	60°C	Extrato de Batata
3	60°C	Extrato de Banana
4	60°C	Extrato de Maçã
4	60°C	Extrato de Berinjela
5	65°C	Extrato de Batata
5	65°C	Extrato de Banana
6	65°C	Extrato de Maçã
6	65°C	Extrato de Berinjela

#### **G.1: Determinação de Atividade Residual**

- 1 – Pipetar 4mL de solução de Catecol 0,2% em tampão fosfato 0,05M pH 6,00 em tubos de ensaio identificados;
- 2 – Transferir 1mL de amostra dos tubos controle, 1 e 2 preparados como descrito na Tabela 1 para tubos contendo 4mL de solução de Catecol 0,2% em tampão fosfato 0,05M pH 6,0;

- 3 – Anotar a coloração após 20 minutos de reação;
- 4 – Verificar o tempo necessário para inativação da PFO.

Tempo em minutos para inativação térmica da polifenoloxidase na presença de bissulfito de Sódio												
Tubo	PFO Batata			PFO Banana			PFO Maçã			PFO Berinjela		
	Temperaturas											
	55°C	60°C	65°C	55°C	60°C	65°C	55°C	60°C	65°C	55°C	60°C	65°C
Controle												
1												
2												

### DISCUSSÃO:

Discutir os resultados obtidos.

Consultar a literatura e discutir no relatório os métodos de controle de escurecimento enzimático em frutas e vegetais.