

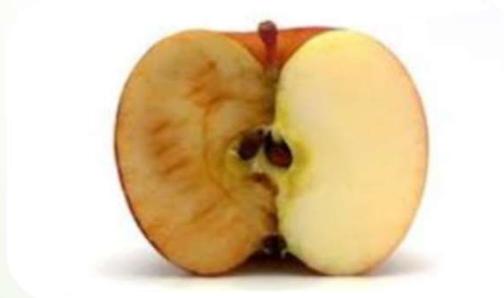


Bioquímica dos alimentos deteriorados: escurecimento enzimático

Prof. Severino Matias de Alencar

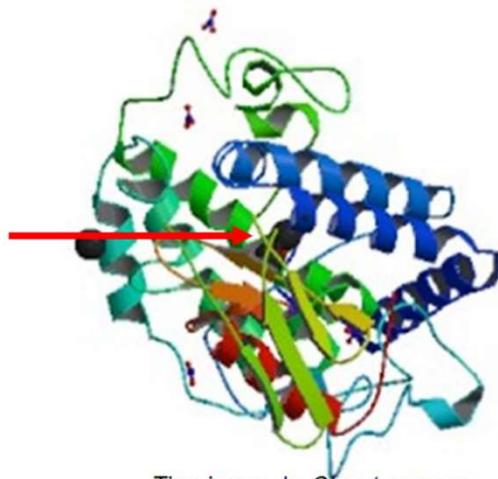
ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO

- O trabalho mais antigo é atribuído a Lindet, que em 1895 reconheceu a natureza enzimática do escurecimento enquanto trabalhava com cidra;
- Polifenoloxidasas estão presentes em grande parte dos seres vivos (animais, vegetais, bactérias e fungos);
- As de maior importância para a ciência de alimentos são as de **plantas, cogumelos comestíveis e crustáceos** (camarão, caranguejo e lagosta);
- O escurecimento enzimático é também um fenômeno que ocorre em muitas frutas, como maçãs e bananas, vegetais, como batatas e também em cogumelos;
- Quando o tecido vegetal é danificado, cortado, descascado, afetado por doença ou exposto a condições anormais, ele **escurece rapidamente quando exposto ao ar**, o que se deve à conversão de compostos fenólicos em **melaninas marrons**;



- Na maior parte dos casos, as PFO estão ligadas a membranas e/ou confinadas em plastídeos;
- Em frutas e hortaliças, o teor de PFO aumenta com a maturação e a senescência;
- Em seu sítio ativo a PFO contém, em geral, dois átomos de cobre, sendo que a reação de oxidação envolve mudanças na valência do cobre e a retirada de elétrons de átomos de oxigênio.

Possuem átomo de cobre no sítio ativo



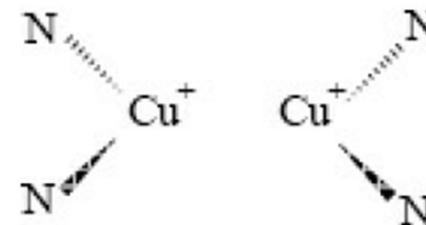
Tirosinase de *Streptomyces castaneoglobisporus*

Peso molecular:

57-62 KDa

Cogumelo:

128 KDa



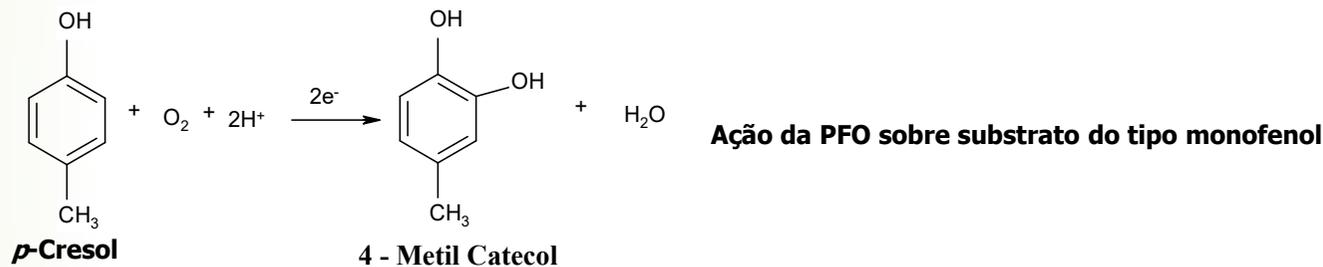
Mecanismo da reação

- **Existem dois tipos diferentes de PFO (Polifenoloxidasas):**

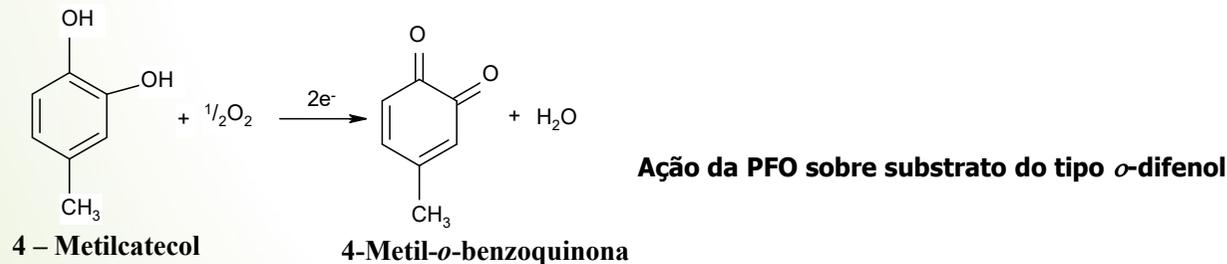
- 1) ***o*-difenol oxidases (chamadas de PFO, catecoloxidasas, tirosinases ou fenolsases);**
- 2) ***p*-difenol oxidases (lacases).**

- **As PFO apresentam, em geral, dois tipos distintos de atividades:**

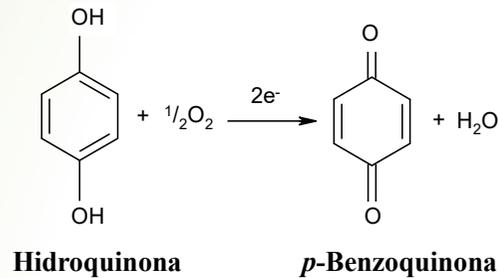
- 1) **Atividade de cresolase (atividade de monofenol mono-oxigenase)**



- 2) **Atividade de catecolase (atividade de *o*-difenol oxidoreductase)**



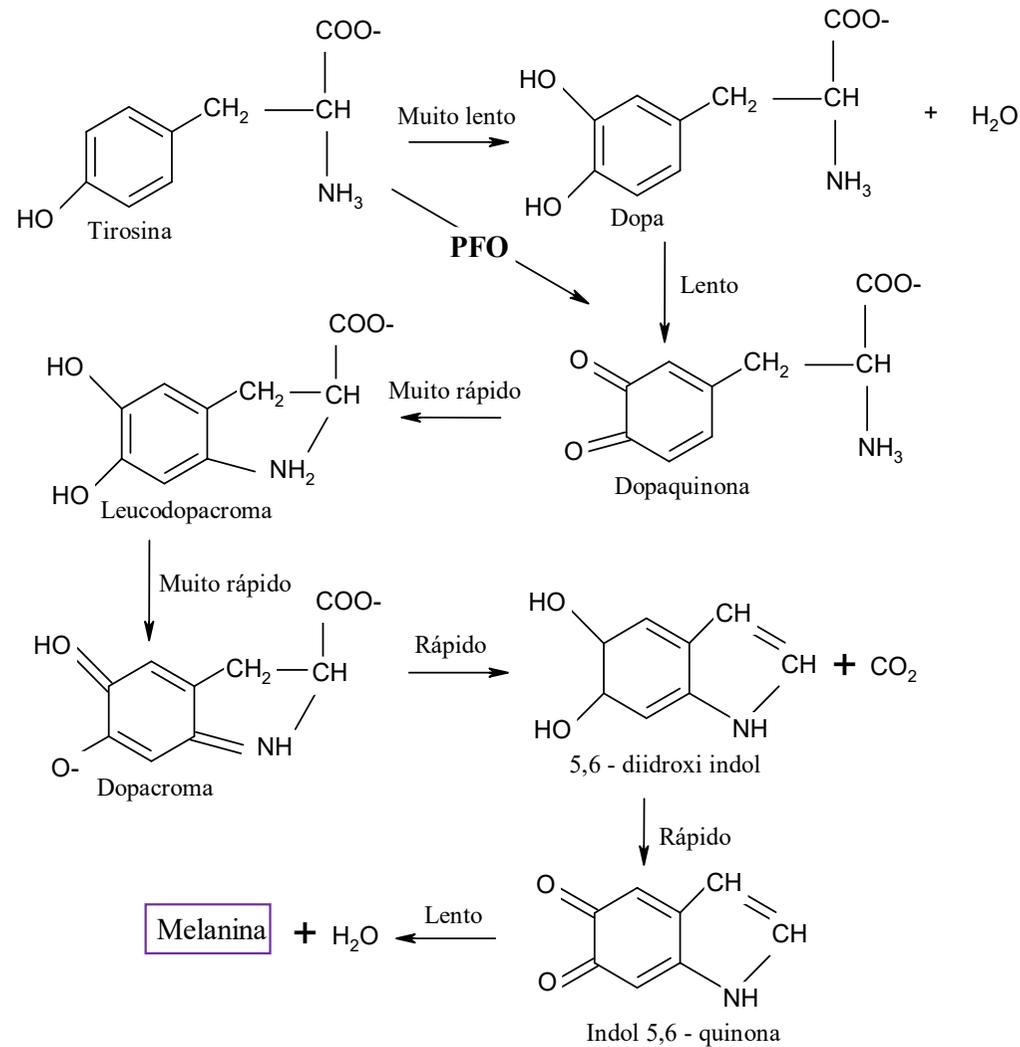
- **As Lacases apresentam atividade de *p*-difenol oxidoredutases**



Ação da lacase sobre substrato do tipo *p*-difenol

- ◆ **O resultado final das reações catalisadas pelas PFO são quinonas;**
- ◆ **Essas substâncias são altamente reativas e se combinam entre si e com outros componentes do meio para gerar produtos de condensação de alta massa molecular e cor escura denominadas de melaninas.**

Mecanismo de formação de melaninas a partir de tirosina



Importância biológica da polifenoloxidase nas plantas

- A PFO pode ter algum papel na biossíntese da betalaína (pigmento vermelho da beterraba);
- Papel protetor da estrutura vegetal/animal contra a infecção por vírus, bactérias e fungos.



TABELA 10.1 Atividade da polifenoloxidase no caju danificado

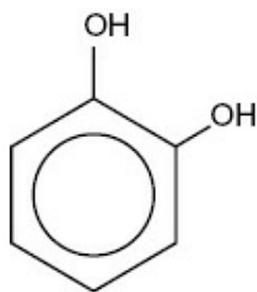
Extrato da enzima	Atividade específica (U/min/mg de proteína)
0 hora (controle)	0,62
2°C/24 horas	2,92
27°C/24 horas	3,33
40°C/24 horas	1,07

Reproduzido de Queiroz *et al.* (2011). © 2011, com a permissão da Elsevier.

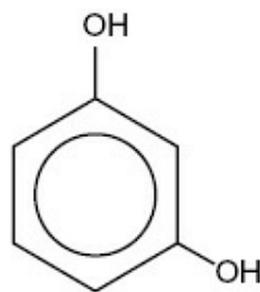
Compostos fenólicos na matéria-prima alimentar

- Fenóis simples (Exemplos, L-tirosina, catecol, resorcinol, hidroquinona, etc.)

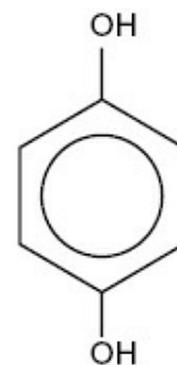
A polifenoloxidação só atua quando a hidroxila está na posição orto



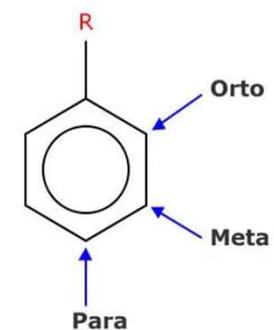
catecol



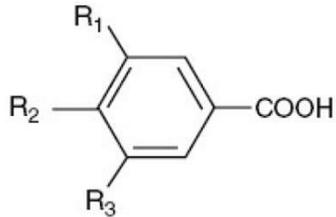
resorcinol



hidroquinona



• **Ácidos fenólicos (derivados do ácido benzóico)**



Ácidos benzoicos

Ácido gálico $R_1=R_2=R_3=OH$

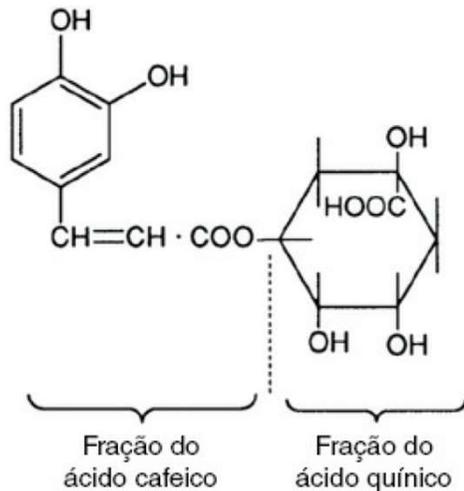
Ácido protocatecuico $R_1=H, R_2=R_3=OH$

Ácido vanílico $R_1=H, R_2=OH, R_3=OCH_3$

Ácido siríngico $R_2=OH, R_1=R_3=OCH_3$

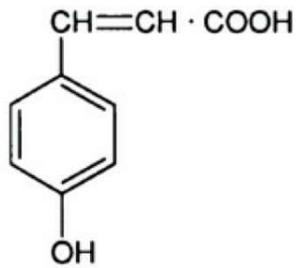
Os ácidos gálico e protocatecuico foram encontrados no caju

• **Ácidos fenólicos (derivados do ácido benzóico)**

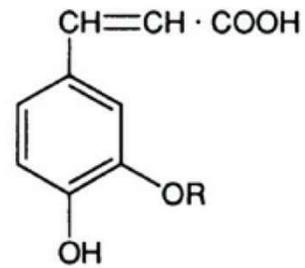


O membro mais importante desse grupo é o ácido clorogênico, que é o substrato-chave do escurecimento enzimático, especialmente nas maçãs e peras

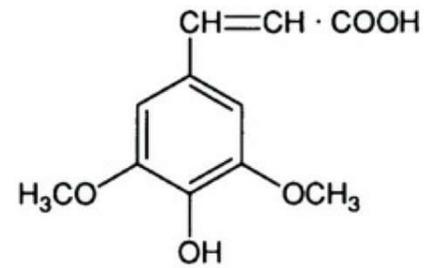
- **Ácidos fenólicos (derivados do ácido benzóico)**



Ácido *p*-cumárico



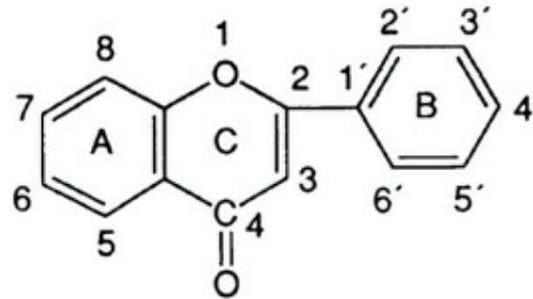
R = H, ácido cafeico
R = CH₃, ácido ferúlico



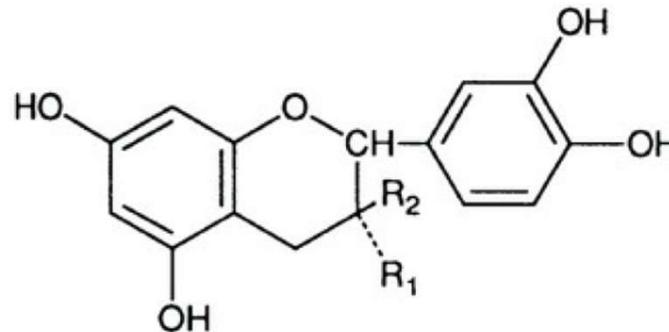
Ácido sinápico

• Flavonoides

Entre os compostos fenólicos, esse grupo é o mais difundido e o que apresenta estruturas mais variadas. Todos os membros desse grupo de compostos estão estruturalmente relacionados com a flavona:



Na matéria-prima alimentar, os flavonoides importantes são as catequinas, as antocianinas e os flavonóis. A estrutura da catequina é apresentada a seguir:



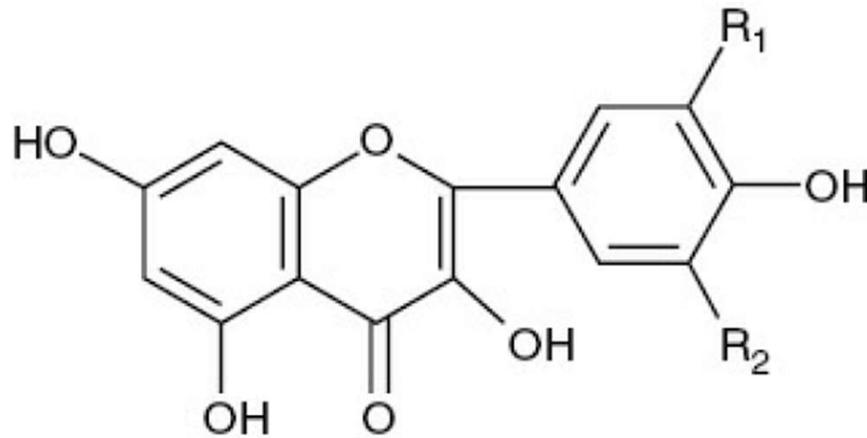
(+) – Catequina ($R_1 = H$; $R_2 = OH$)

(-) – Epicatequina ($R_1 = OH$; $R_2 = H$)

continuação...

Bioquímica dos alimentos deteriorados: escurecimento enzimático

• Flavonoides



Canferol ($R_1 = R_2 = H$)

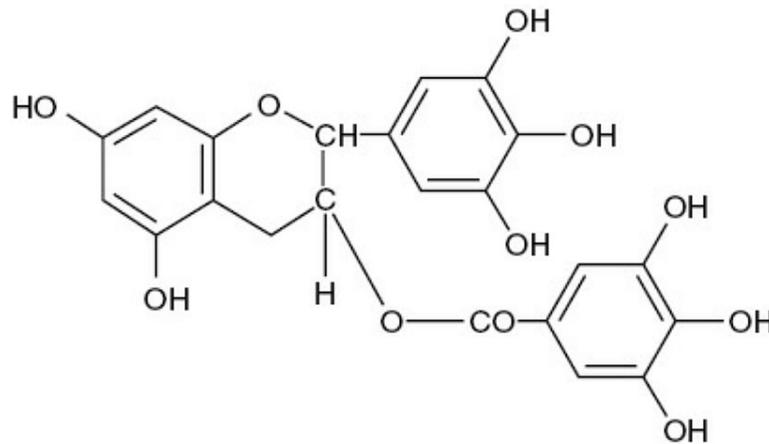
Quercetina ($R_1 = OH$; $R_2 = H$)

Miricetina ($R_1 = R_2 = OH$)

continuação...

• Flavonoides

Um grupo hidroxila adicional ligado na posição 5' do anel B da catequina e da epicatequina dá origem à galocatequina e à epigalocatequina, respectivamente.

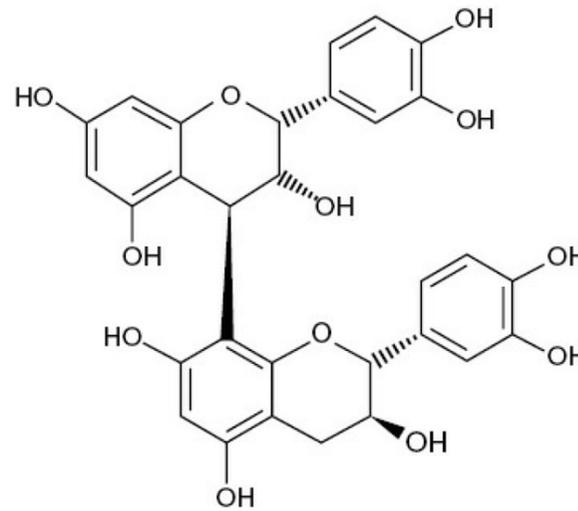


Esses compostos não são os principais fenóis das frutas, mas são constituintes importantes presentes nas formas oligomérica ou polimérica, como as proantocianidinas (ou **taninos condensados**).

continuação...

• Flavonoides

A procianidina é um dímero e está presente na maçã, na uva e na cereja



Procianidina B-1

- ◆ **Todos os compostos discutidos até aqui são substratos da PFO;**
- ◆ Essas reações de oxidação são importantes na fermentação do chá, no escurecimento dos pêssegos e na etapa de secagem da cura das sementes frescas de cacau (desenvolvimento da cor, do sabor e do aroma finais do cacau e do chocolate);
- ◆ **A PFO desempenha um papel benéfico na fermentação do chá e do cacau, o que contrasta com seu papel no escurecimento de frutas e vegetais.**

- A epicatequina é o **substrato** endógeno da **PFO da lichia e da longana**;
- Outros flavonoides, como o eriodictiol, a miricetina e a fisetina, também podem ser oxidados pela PFO;
- As antocianinas não são oxidadas diretamente pela PFO, pois são substratos inadequados para a enzima;
- PFO da lichia oxida a epicatequina e os produtos da oxidação, por sua vez, degradam a antocianina da lichia, levando à reação de escurecimento.

POLIFENOLOXIDASE EM ALIMENTOS E NO PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

1. O papel da polifenoloxidase na “fermentação” do chá

- A produção do chá-preto depende das alterações oxidativas que os polifenóis das folhas de *Camellia sinensis* sofrem durante o processamento;
- Essas alterações são especialmente importantes para o desenvolvimento da cor e para a redução do gosto amargo associado ao tanino não oxidado (composto polifenólico);
- Vários tipos de chá, como o chá-branco, o chá-verde, o chá oolong e o chá-preto, originam-se da mesma planta, a *C. sinensis*;
- Os principais polifenóis das folhas do chá, determinados pela cromatografia por partição, englobam a (+)-catequina, a (-)-epicatequina, a (+)-galocatequina, a (-)-epigalocatequina, o (-)-galato de epicatequina e o (-)-galato de epigalocatequina.

PLANTA - Folhas



FOLHAS, CHÁ VERDE E PRETO



Colheita da Camellia sinensis



Tipos de chás produzidos da Camellia sinensis



- 1 - Primeiras folhas 2 - Folhas terciárias ou adultas
3 - Folha enrolada de chá verde 4 - Folha enrolada para chá preto
5 - Chá preto

Chá branco (white tea) – Folhas jovens ou brotos recentes sem oxidação e clorofila.

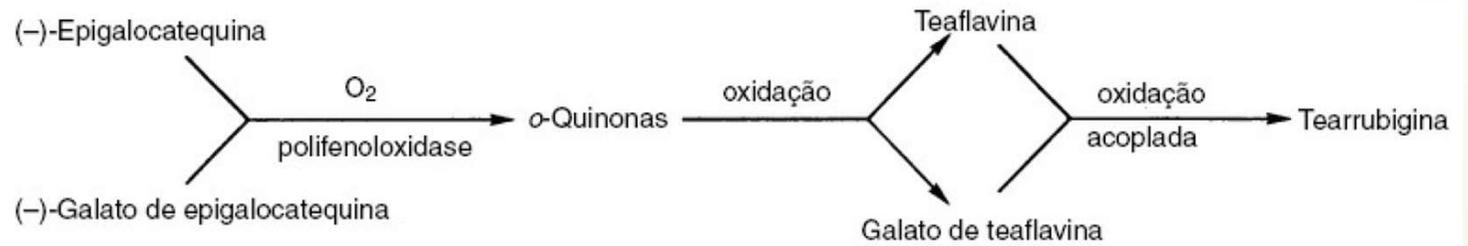
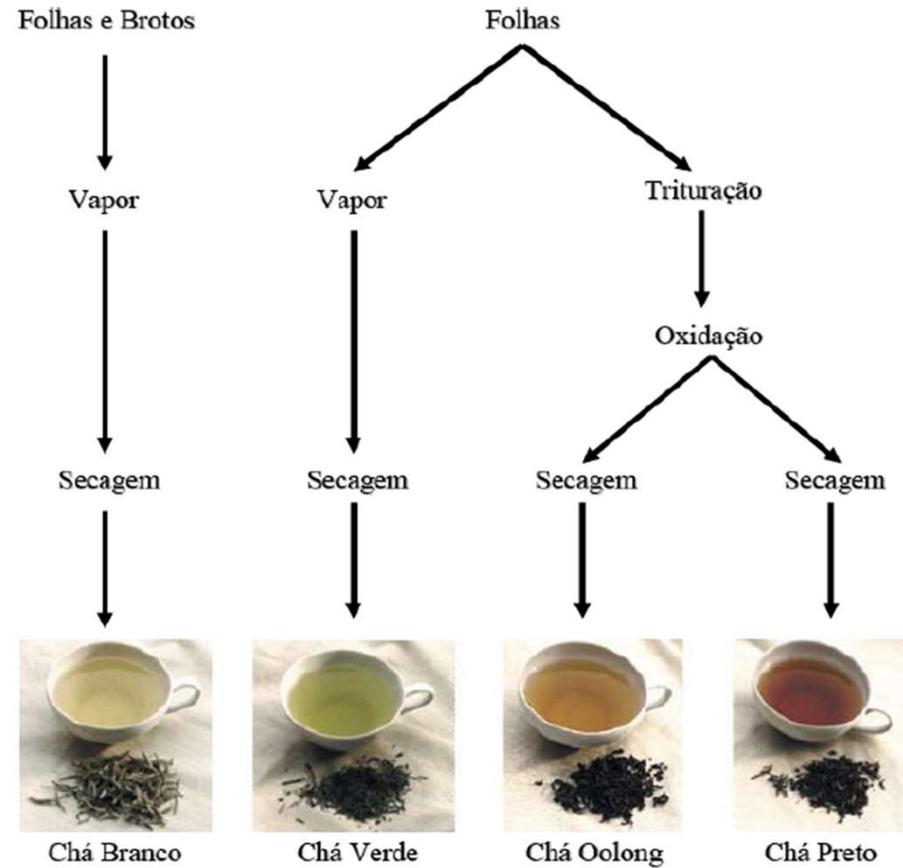
Chá verde (green tea) – Sem oxidação. Kukicha ou chá de inverno – Ramos e folhas adultas podadas da planta em sua fase dormente e secas sobre fogo. Japão.

Oolong – A fermentação (oxidação) é interrompida em um momento qualquer.

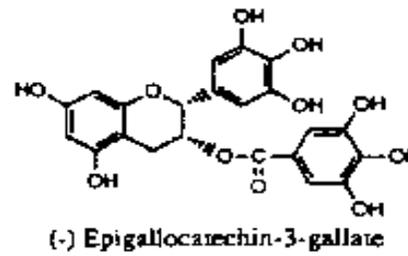
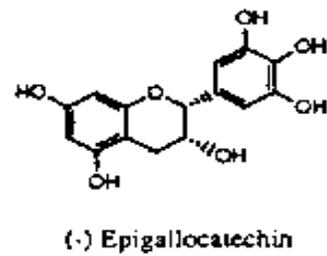
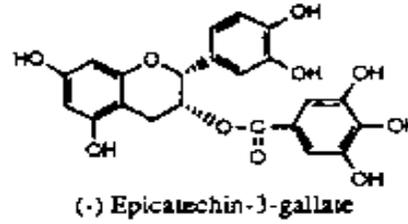
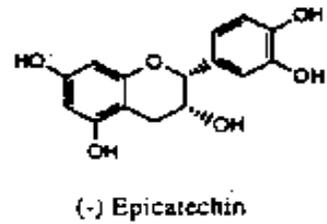
Chá preto (black tea) – Fermentação prolongada, consumo em um ano. Pu-erh - É uma sub-classe de chá preto, pouco usual. Consumo até mais de 50 anos. Odor e sabor a terra, causado por fungos. **Maior valor comercial no Ocidente.**

Variações não usuais – Comumente associadas com a Medicina Tradicional chinesa e sem nomenclatura definida.

Transformações oxidativas da epigalocatequina e seu galato durante a "fermentação do chá".



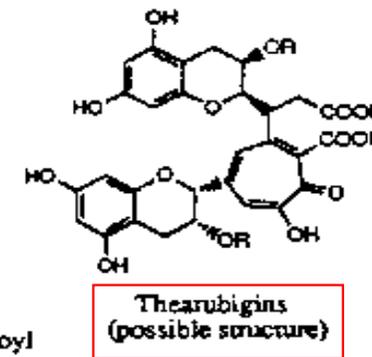
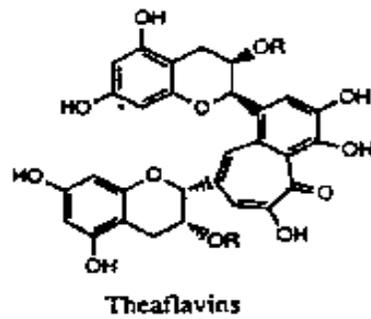
Alteração química na produção do chá preto



Major Components of Green Tea

Fermentation

Tea Polyphenol Oxidase



R=Galloyl

Major Components of Black Tea



TABELA 10.4 Composição de flavonoides do chá (porcentagem por massa seca)

Componente	Chá-verde	Chá-preto
Flavonoides totais	15-25	15-25
Catequinas totais	12-18	2-3
(-)-Epicatequina	1-3	< 1
(-)-Galato de epicatequina	3-6	< 1
(-)-Epigallocatequina	3-6	< 1
(-)-Galato de epigallocatequina	9-13	1-2
Flavonóis	2-3	1-2
Teaflavinas	< 1	4
Outros polifenóis	2-4	7-15

Reproduzido de Hodgson e Croft (2010). © 2010, com permissão da Elsevier.

2. Escurecimento de camarões e outros crustáceos

- Nos crustáceos, a PFO está localizada principalmente na cutícula;
- Durante a estocagem dos crustáceos em gelo, a PFO inativa armazenada nos hemócitos e nas glândulas digestivas também pode ser ativada pela ação de enzimas proteolíticas que vazam do trato digestivo;
- Os métodos tradicionais incluem o uso de formulações à base de sulfito, mas este provoca reações adversas;
- Camarões tratados com ácido ferrúlico a 2% após 10 dias de armazenamento apresentaram uma pontuação de melanose mais baixa e pontuações mais altas para cor, sabor e aceitação global, quando comparados com os camarões do grupo de controle.



CONTROLE OU INIBIÇÃO DO ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO

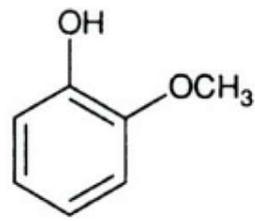
É necessário inativar a PFO a fim de minimizar as perdas de produtos causadas pelo escurecimento

- **Exclusão do oxigênio**

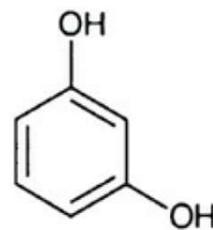
- ◆ O método mais simples de controle do escurecimento enzimático consiste na **imersão em água do produto descascado**, como as batatas, antes do cozimento;
- ◆ Uma técnica que pode ser feita facilmente em casa para limitar o acesso do oxigênio ao tecido cortado da batata;
- ◆ O método é limitado, visto que as frutas e os legumes escurecem quando reexpostos ao ar ou por causa do oxigênio produzido naturalmente pelos tecidos vegetais;
- ◆ A remoção do oxigênio dos tecidos das frutas e legumes pode levar à anaerobiose, se eles forem armazenados por períodos prolongados, o que, por sua vez, pode levar à formação de metabólitos anormais e à decomposição dos tecidos.

• **Inibidores químicos da polifenoloxidase**

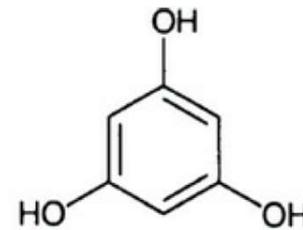
◆ Diferentes compostos são capazes de controlar o escurecimento enzimático e, com base no mecanismo da inibição, esses compostos são classificados em agentes redutores, agentes quelantes, acidulantes, inibidores enzimáticos, tratamentos enzimáticos e agentes formadores de complexos



Guaiacol

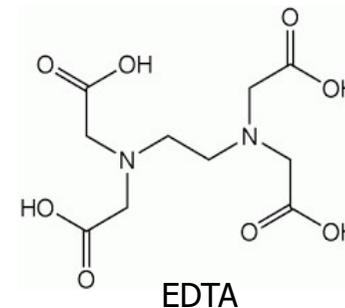
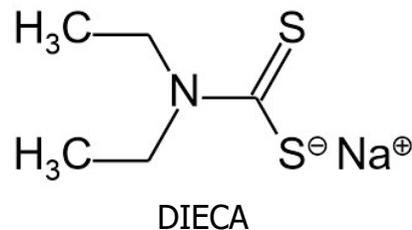


Resorcinol

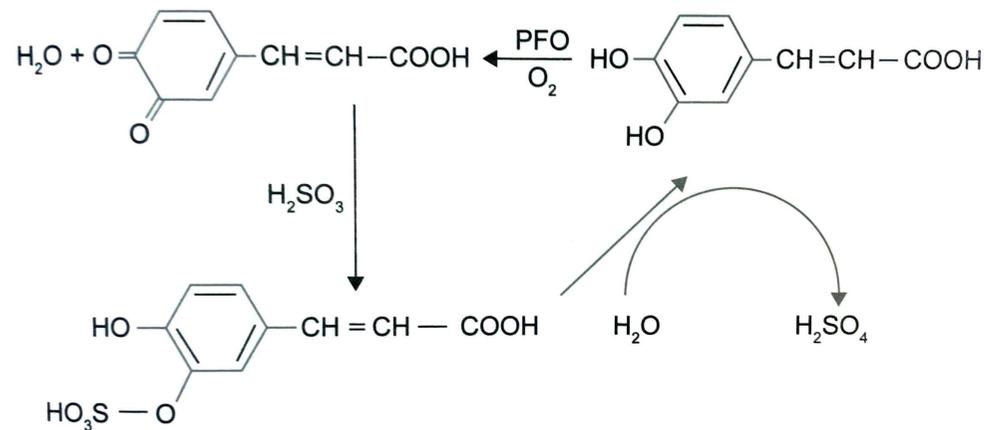


Floroglucinol

◆ Visto que a PFO é uma metaloproteína que tem cobre como grupo prostético, ela pode ser inibida por diversos agentes quelantes, entre eles o dietilditiocarbamato de sódio (DIECA), a azida de sódio, o etilxantato de potássio e o etilenodiaminotetraacetato (EDTA).

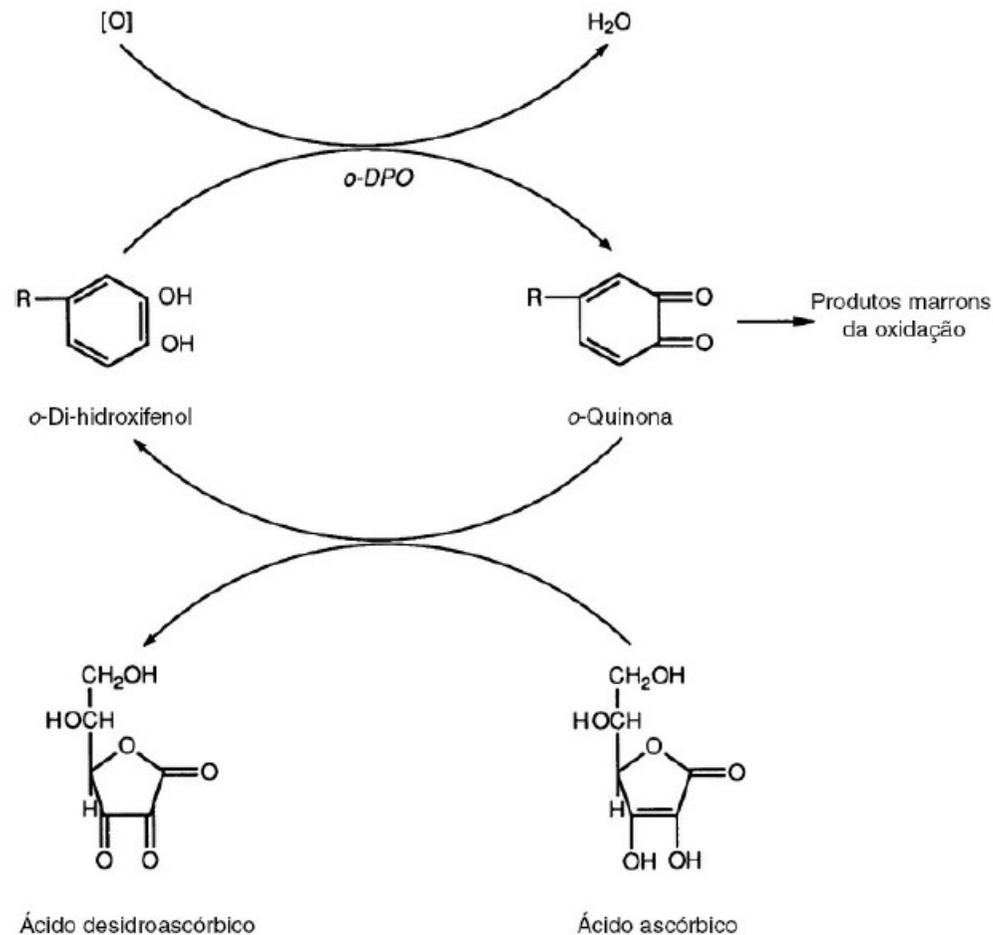


- ◆ Os sulfitos são inibidores fortes e foram utilizados, durante muito tempo, na indústria alimentícia. No entanto, o uso excessivo de formulações à base de sulfito pode causar reações adversas, principalmente nos indivíduos asmáticos.



- ◆ A L-cisteína é também inibidor eficaz da PFO, por agir como agente acoplador de quinonas e também como agente redutor
- ◆ Emprego de ácidos encontrados naturalmente nos tecidos vegetais, como os ácidos cítrico, málico, fosfórico e ascórbico. Esse método se baseia no fato de que a diminuição de pH do tecido vegetal reduz ou retarda o desenvolvimento do escurecimento enzimático. O pH ótimo para a maioria das PFOs está entre pH 4,0 e 7,0, ocorrendo pouca atividade abaixo de pH 3,0.

♦ O ácido ascórbico é um inibidor particularmente eficaz da PFO. Na concentração utilizada para inibir essa enzima, o ácido ascórbico **não tem sabor detectável**, nem ação corrosiva sobre os metais. Essa vitamina age como antioxidante, porque reduz a quinona produzida antes que ela seja submetida às reações secundárias que levam ao escurecimento e também diminui o pH associado à atividade enzimática.



• Processamento térmico

- ◆ O branqueamento é o método mais comum utilizado para inativar enzimas vegetais;
- ◆ A inativação da PFO ocorre em temperaturas de 70°C-90°C.

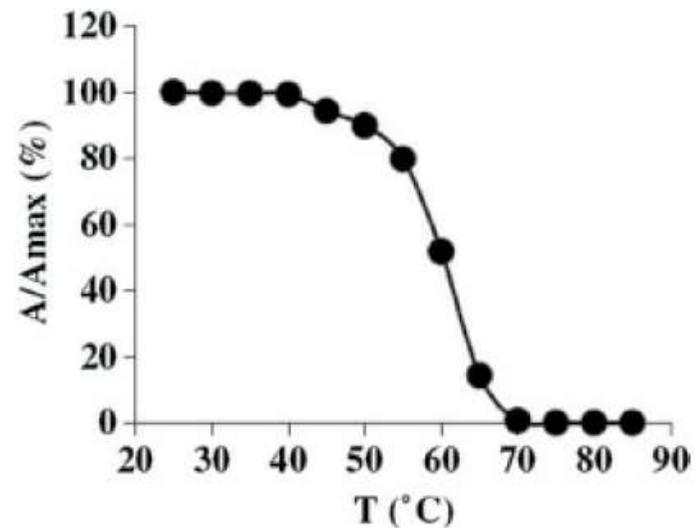


FIGURA 10.9 Estabilidade térmica do extrato de polifenoloxidase da uva Victoria. A atividade residual foi medida após um tratamento de 10 minutos em diferentes temperaturas. Reproduzido de Rapeanu *et al.* (2006). © 2006, com permissão da Elsevier.

- **Processamento com alta pressão**

- ◆ Em estudos que visavam à diminuição da atividade da PFO em purê de banana, lichia e suco de cenoura, os melhores resultados foram obtidos em pressões superiores a **400 Mpa** combinadas com aquecimento brando (50°C). Por outro lado, pressões baixas (até 400 MPa) induziram a ativação da PFO na pera (200-400 MPa, 25°C, 10 minutos) e no suco de maçã (100 MPa, 1 Minuto).



- **Radiação gama**

- ◆ Baixas de radiação g (1 ou 2 kGy) inibiu a atividade da PFO da beterraba vermelha recém-cortada.

- **Campo elétrico pulsado**

- ◆ Consiste na colocação do alimento em uma câmara com dois eletrodos que emitem pulsos de alta voltagem (20-80 kV) por um curto período (microsegundos);
- ◆ A inativação comercial da PFO depende da intensidade do campo elétrico e do tempo do tratamento. A maior redução da atividade da PFO foi de 76,2%, a 25 kV/minuto durante 744 μ s . A PFO do extrato de maçã mostrou uma diminuição de 97%, com 24,6 kV/cm durante 6000 μ s, de 72% na PFO da pera, com 22,3 kV/cm durante o mesmo tempo de tratamento, e de 70% na PFO do pêsego, com 24,3 kV/cm durante 5000 μ s.

Ainda hoje será disponibilizado material texto na plataforma e-disciplina

Obrigado