

Avaliação da atividade de enzimas do grupo das fenoloxidasas em polpa de batata doce (*Ipomoea batatas*)*

MARNEY PASCOLI CEREDA**, ADA M. CAGLIARI***, A. M. HEEZEN**, R. B. FIORETTO**

ABSTRACT

For the purpose of evaluating the enzymatic action of the phenol oxidase and polyphenol groups in sweet potato pulp, a suitable method was sought which would not involve very complex laboratory techniques. After testing, the following techniques were established. cylinders of sweet potato tissues were extracted by the tubercle transversal line direction and 60 discs cut. After being weighed, 30 discs were in the test. They were placed into Erlenmeyer flasks containing 25 ml of distilled water, 5 ml of a 1,0 per cent solution of phenol in water, and 2 drops of saturated $HgCl_2$ solution in water. The other 30 discs, after being weighed, were the control samples, and were put into test tubes (17 mm \times 175 mm) which had the same quantities of the Erlenmeyer solutions. The control samples sealed with paraffin and both tests incubated for 24 hours at 30C, filtered and read at 450 nm or by means of a Klett-Summerson colorimeter using a blue filter.

Introdução

E FATO conhecido que todo o escurecimento oxidativo de frutas é catalizado pelas enzimas do grupo das fenoloxidasas e polifenoloxidasas (3).

As batatas doces possuem este grupo de enzimas, capazes de oxidar os substratos fenólicos (fenóis e polifenóis) da própria batata, dando como productos polímeros de coloração pardo-escuros (1). Esta oxidação se dá em presença de oxigênio livre, escurecendo rapidamente a superfície recém cortada dos tubérculos, prejudicando sua aparência e a de seus produtos (2, 4, 5). No uso potencial da batata doce como materia prima para indústria, é de grande interesse avaliar a ação destas enzimas, a fim de que variedades que escurecem muito possam ser descartadas ou processadas de maneira a minimizar este inconveniente.

Por outro lado, os métodos encontrados na literatura mostraram-se excessivamente complexos para a finalidade proposta, e mais indicados para estudos bioquímicos (4, 5).

Por estas razões procurou-se adaptar um método que possibilite a avaliação, sem que se torne necessário proceder ao isolamento e purificação das enzimas, e que permita sua aplicação utilizando um equipamento mais simples.

O método proposto baseia-se na ação das enzimas sobre substratos fenólicos, em presença de oxigênio, com a conseqüente formação de compostos escuros (1).

Materialis e métodos

O material utilizado foi:

- Variedades de batata doce (*Ipomoea batatas*) procedentes da Fazenda Experimental São Manoel, S. P. Entre estas variedades encontram-se tubérculos com polpa (parênquima cortical amiláceo) de cor creme, roxa e laranja.
- Espectrocolorímetro Coleman-Junior, modelo 295.
- Colorímetro Klett-Summerson, modelo 800-3 com filtros:

azul	(400 - 450 nm)
verde	(520 - 580 nm)
vermelho	(640 - 700 nm)

* Recebido para publicação 27 dezembro 1979.

** Faculdade de Ciências Agronômicas, Campus de Botucatu UNESP, 18610 Botucatu, SP, Brasil.

*** Faculdade de Ciências Biológicas, Campus de Botucatu, 18610 Botucatu, SP, Brasil.

- d) Cilindro cortador de rolhas.
- e) Bisturi.
- f) Congelador marca 'Prosdócimo'.
- g) Estufa bacteriológica marca 'FANEM', regulada a 30°C.
- h) Solução aquosa de fenol P A, a 1%, vol/vol.
- i) Solução saturada de HgCl₂.
- j) Solução aquosa de ácido ascórbico P A, a 1%.
- k) Parafina.
- l) Frascos erlenmeyer de 125 ml.
- m) Tubos de ensaio de 17 mm x 175 mm.

Extraiu-se um cilindro de tecido de batata doce, com o cortador de rolhas, no sentido transversal do tubérculo, de modo a amostrar as diversas camadas do tecido. Este cilindro foi rapidamente cortado em fatias, o mais uniforme possível. Os discos assim obtidos foram recolhidos em plástico, pesados e armazenados em congelador a -10°C até o momento da análise.

No momento da análise os discos foram colocados em água que continha o substrato fenólico e incubados a 30°C por 24 horas, com o que se conseguiu um líquido de coloração pardo-escuro.

No final do ensaio o líquido foi filtrado e lida sua densidade ótica.

Durante a exposição do trabalho indicaremos quais as modificações realizadas neste método básico afim de fixar as melhores condições do ensaio.

Resultados e discussão

A base para a tentativa de adaptação do presente método foi o fato de que, para o escurecimento oxidativo ocorrer, três componentes devem agir em conjunto: enzima, substrato e oxigênio. Se qualquer dos três faltar ou for impedido de agir de qualquer maneira, a oxidação e o escurecimento não ocorrem (2).

Através da realização de uma série de ensaios procuramos fixar as condições de análise.

Podemos notar pelos resultados do Quadro 1, que a adição de fenol aumentou a absorção de luz, em consequência do aumento de intensidade da coloração parda, o que foi possível observar visualmente. Isto ocorreu para os três tipos de batatas doce ensaiadas.

O fato sugere que, apesar da presença de substratos fenólicos no tecido de batatas doces, estes encontram-se em concentrações limitantes em relação às enzimas contidas nos 20 discos, para as condições ensaiadas.

Quadro 1.—Influência da adição de substrato (solução aquosa de fenol 1%).

Variedades	Peso de 20 discos (em grama)	H ₂ O ml	Fenol 1% ml	Leitura em D. O. x 1000 filtros*		
				Azul	Verde	Vermelho
Creme	2,12	25	—	22	0	2
Creme	2,43	25	2	22	11	5
Roxa	2,30	25	—	250	286	21
Roxa	2,16	25	2	570	355	43
Laranja	2,46	25	—	16	0	0
Laranja	2,45	25	2	41	9	3

* Colorímetro Klett-Summerson.

Com relação as leituras de D.O., dos filtros utilizados, o azul (400 - 450 nm), foi o que mostrou valores mais altos de absorção. Neste ensaio notamos um início de fermentação nos líquidos, após 24 horas, devido ao fato dos discos de tecidos conterem elevado teor de substâncias fermentescíveis. Para evitar este inconveniente passamos a acrescentar aos ensaios seguintes 2 gotas de solução saturada de HgCl₂, o que não causou interferência no método (Quadros 2, 3, e 4).

No ensaio realizado cujos dados constam do Quadro 2, pudemos observar o efeito de HgCl₂, já que os líquidos permaneceram translúcidos, sem presença de

bolhas ou sedimentos que indicassem crescimento microbiano, o que foi confirmado por exame ao microscópio. Notamos pelo exame das D.O. indicadas no Quadro 2, que o filtro azul apresentou maiores valores de absorção, sendo portanto mais indicado do que o verde para medir a intensidade da coloração formada. O filtro vermelho foi eliminado deste ensaio. Outro fato que pudemos observar foi que os tratamentos de 30 discos, mesmo quando permaneceu o volume de fenol utilizado no primeiro ensaio (Quadro 1), mostrou valores mais elevados de absorção. Isto parece indicar que com a adição de 2 ml de solução de fenol a 1%, a quantidade de enzimas passa a ser

Quadro 2.—Influência do substrato e do número de discos de tecidos

Variedades	Peso dos discos (em grama)		H ₂ O ml	Fenol 1% ml	HgCl ₂ gotas	D O, x 1000 filtros*	
	20 discos	30 discos				Azul	Verde
Creme	1,85	—	25	4	2	16	9
Creme	—	3,23	25	2	2	34	19
Roxa	2,02	—	25	4	2	451	307
Roxa	—	3,33	25	2	2	650	600
Laranja	2,15	—	25	4	2	34	19
Laranja	—	3,52	25	2	2	53	34,5

* Colorímetro Klett-Summerson.

Quadro 3.—Padronização do ensaio em branco e escolha do comprimento de onda mais adequado.

Variedades	Ensaio	Peso de 30 discos (em grama)	H ₂ O ml	HgCl ₂ gotas	Fenol 1% ml	Outros
Roxa	A	2,30	25	2	5	—
Roxa	B	2,55	25	2	5	selado com parafina
Roxa	C	2,58	25	2	5	5 ml ácido ascórbico a 1% e selado com parafina
Roxa	D	—	25	2	5	—

Tratamentos:

- A Ensaio completo.
 B Ensaio em branco, com exclusão do ar, por selagem com parafina.
 C Ensaio em branco, onde além do selo de parafina houve adição de ácido ascórbico em solução aquosa a 1%
 D Ensaio para verificar a possibilidade de escurecimento apenas por contacto do substrato fenólico com oxigênio, ou ação da solução de HgCl₂.

o fator limitante na reação. Portanto, a partir do segundo ensaio (Quadro 2), a quantidade de discos foi fixada em 30, com um peso médio (no ensaio) de 3,36 g. O volume de solução de fenol a 1% foi fixado em 5 ml para que o substrato permanecesse em excesso.

No terceiro ensaio, estruturado no Quadro 3, procuramos determinar a melhor maneira de realizar um ensaio em branco de modo a eliminar a interferência causada pela cor da polpa da batata doce. Trabalhamos apenas com variedades de polpa roxa, já que apenas neste caso a cor da polpa chegou a interferir com coloração formada pela atuação das enzimas, impossibilitando a comparação entre estas variedades e as de polpa de coloração clara. Neste ensaio procuramos também definir o comprimento de onda a ser utilizado, em função do próprio ensaio em branco, utilizando um espectrocolorímetro de variação linear entre 400 e 700 nm. A variação entre as leituras foi de 10 nm, limite de sensibilidade para este modelo de aparelho.

Procuramos estabelecer este ensaio em branco baseando-nos na afirmação de Shultz (2) de que para que o escurecimento oxidativo possa ocorrer três componentes devem agir em conjunto: enzima, substrato e oxigênio. Se qualquer dos três fatores faltar ou for impedido de agir de qualquer maneira, a oxidação e escurecimento não ocorrem. O autor afirma também que destes fatores que influem, "a remoção do oxigênio é o meio mais satisfatório para impedir a ação das enzimas", e nesta afirmação nos baseamos ao montar o tratamento B. No tratamento C, baseamos-nos ainda no mesmo autor, que afirma que depois do SO₂, os métodos mais utilizados como inibidores químicos da reação enzimática são os ácidos. Como o ácido ascórbico reúne o efeito de acidez e o efeito redutor (3) julgamos interessante avaliar sua ação.

Pela análise dos resultados obtidos dos ensaios A, B, C e D, (Quadro 4), representados graficamente na Figura 1, pudemos observar que a faixa compreendida entre 440 e 460 nm mostrou os maiores valores de D O, para a coloração parda do ensaio completo

Quadro 4.—Resultados de densidade ótica (x 1000) de tratamentos para padronização de ensaio em branco.

Comprimento de onda nm	Densidade ótica			
	Tratamento A	Tratamento B	Tratamento C	Tratamento D
400	1222	229	432	0
410	1155	119	237	0
420	1071	86	102	0
430	1000	0	4	0
440	866	0	0	0
450	824	0	0	0
460	770	0	0	0
470	721	0	13	0
480	699	0	81	0
490	658	56	155	0
500	638	125	252	0
510	602	222	347	0
520	561	310	444	0
530	509	398	509	0
540	444	377	509	0
550	367	9	420	0
560	268	0	233	0
570	161	0	78	0
580	51	0	0	0
590	0	0	0	0
600	0	0	0	0
610	0	0	0	0
620	0	0	0	0
630	0	0	0	0
640	0	0	0	0
650	0	0	0	0
660	0	0	0	0
670	0	0	0	0
680	125	0	13	0
690	256	97	155	0
700	342	222	252	0

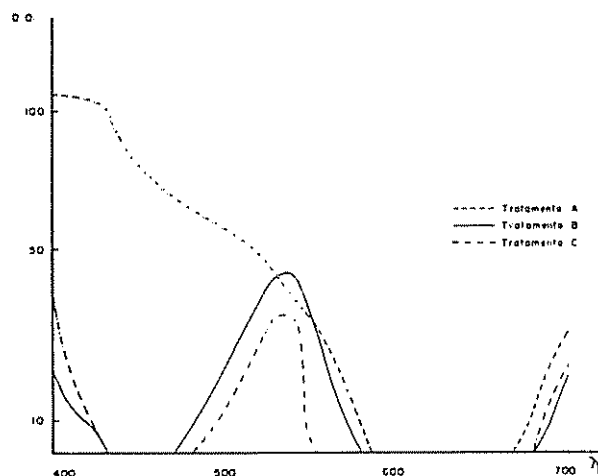
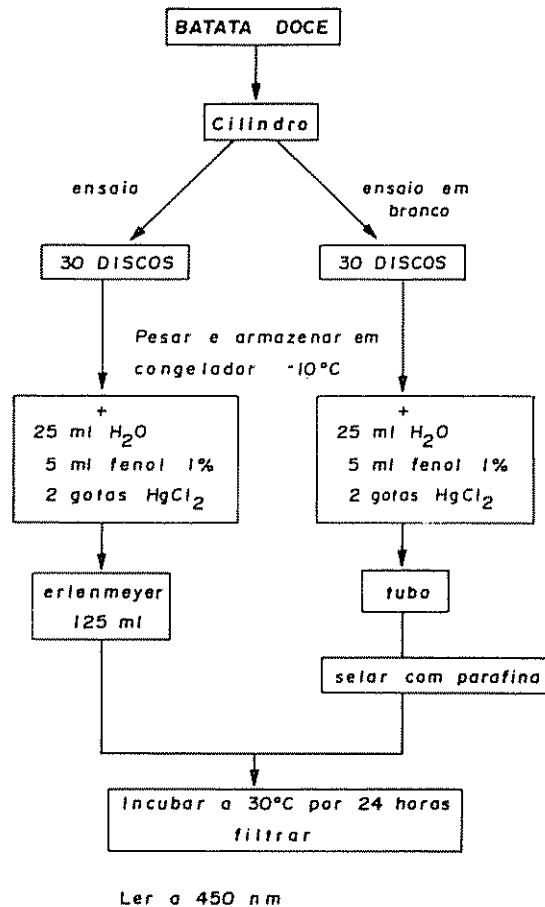


Fig. 1.—Espectro de Absorção para os Tratamentos A, B e C.



(A) e menor absorção para a coloração rósea decorrente da coloração da polpa da batata doce roxa e que constituiu o ensaio em branco (B), o principal interferente no método que pretendemos padronizar. Nesta

$$\text{CÁLCULO} = \frac{\text{LEITURA D.O.} - \text{LEITURA "BRANCO" D.O.}}{\text{peso amostra (30 discos)}}$$

Fig. 2.—Fluxograma do método de avaliação da ação de enzimas do grupo das fenoloxidasas, em polpa de batata doce.

faixa de comprimento de onda podemos afirmar que não há interferência da cor da polpa da batata roxa, já que o ensaio B inclusive mostrou D. O. igual a 0, como no ensaio D, onde não havia discos de tecidos. O ensaio C foi abandonado, uma vez que mostrou visualmente uma coloração rósea, decorrente da descoloração da polpa por ação do ácido, evidente pela curva de D.O. no gráfico da Fig. 1. O comprimento de onda escolhido foi de 450 nm, ponto médio da faixa estabelecida, correspondendo ao filtro azul do colorímetro Klett-Summerson.

Dos resultados obtidos nos ensaios, fixamos as condições da análise segundo o esquema anexo (Fig. 2).

Conclusões

O método proposto mostrou bom desempenho, nas condições de ensaio, avaliando o escurecimento enzimático sem exigir técnicas laboratoriais complexas.

Resumo

Com o objetivo de avaliar a ação das enzimas do grupo das fenoloxidasas e polifenoloxidasas em polpa de batata doce, procuramos adaptar um método que não envolvesse técnicas laboratoriais complexas. Após ensaios, foi fixada a seguinte técnica: cilindros de tecido de polpa de batata foram extraídos no sentido transversal do tubérculo e cortados em 60 discos. Após pesagem, 30 discos constituíram o ensaio, colocados em

recipiente de vidro que continha 25 ml de água destilada, 5 ml de solução aquosa de fenol a 1% e 2 gotas de solução aquosa saturada de $HgCl_2$. Os outros 30 discos, após pesagem, constituíram o ensaio em branco, sendo colocados em tubo de ensaio (17 mm x 175 mm) que continha as mesmas quantidades das soluções do ensaio. O tubo era selado com parafina e ambos os ensaios incubados a 30°C por 24 horas após o que eram filtrados e lidos a 450 nm ou com o filtro azul do colorímetro Klett-Summerson.

Literatura citada

1. DOCKWORTH, R. B. Frutas y verduras. Zaragoza, Acribia, 1968, 36 p.
2. HERNANDEZ, H. H. e VOSTI, D. C. Dark discoloration of canned allgreen asparagus. Food Technology 17: 95-99. 1963.
3. SHULTZ, H. W. Food enzymes. Westport, Avi Publishing, 1960. pp. 105-123.
4. SCOTT, L. E.; TWIGG, B. A. e BOUWKAMP, J. C. Color of processed sweet potatoes: effects of can type. Journal of Food Science 39: 563-564. 1974.
5. SMITILE, D. A. e SCOTT, L. E. Internal can corrosion by processed sweet potatoes as affected by phenolase activity and nitrate concentration. Journal of the American Society of Horticultural Science 94: 649-654. 1969.

Notas y Comentarios

Gasolina de carbón

Cuando se acabe el petróleo, el mejor sustituto de la gasolina será un combustible sintético hecho de carbón, arenas bituminosas o esquistos, según manifestó recientemente la Betchel Corporation de San Francisco (*The Economist* October 20th, 1979). Las cifras confirman que parte de las pizarras y arenas aceitadas, sólo la licuefacción del carbón es económica para producir un combustible sintético.

Los automóviles y aviones necesitan combustibles muy refinados. La gran desventaja del carbón, comparado con el petróleo crudo es su baja proporción hidrógeno/carbón, de 0,8 a 1. Para convertirlo en combustible para transporte, esta tiene que ser elevada hasta 1,8 a 1. Hay dos formas básicas de conseguir esto:

La ruta de *síntesis* descompone (gasifica) primero el carbón en el llamado gas "productor", que contiene monóxido de carbono e hidrógeno. Se usan entonces catalizadores para reconstituir una gama de combustibles. Esta es la base del famoso proceso Fischer-Tropsch (Cf. *Turrialba* 29:173) usado extensivamente en Alemania durante la segunda guerra mundial. Los productos resultantes tienen la tendencia de tener largas cadenas moleculares y son más apropiadas para combustibles tipo diesel y de aviones a chorro.

La ruta de la *degradación*, más atractiva pero más difícil, produce combustibles líquidos directamente sin necesidad

de gasificar al carbón. La proporción hidrógeno/carbón se eleva ya sea agregando hidrógeno (hidrogenación) o sustrayendo carbono (pirólisis). Los productos tienden a poseer moléculas en anillo (aromáticos) (Cf. *Turrialba* 29: 174), lo que los hace especialmente apropiados para combustibles de alto octanaje para motores.

Solamente la firma Sasol en Africa del Sur está haciendo actualmente gasolina de carbón en escala comercial. Usando el proceso Fischer-Tropsch, sintetiza alrededor de 20 galones de gasolina por cada tonelada de carbón usada. Una nueva planta, que costará 1,8 mil millones de dólares (a precios de 1976), comenzará a funcionar en 1981. La fábrica aumentará el rendimiento de gasolina a cerca de 60 galones por tonelada de carbón.

Las futuras plantas de petróleo de gasolina es probable que sigan la ruta de la degradación. Estados Unidos tiene unas dos docenas de procesos de degradación en desarrollo, la mayoría basados en la extracción por solventes. Los más avanzados son:

El proceso de *carbón refinado por solventes* (SRC) que usa aceite de antraceno (derivado durante el proceso) para disolver carbón pulverizado caliente bajo presión. El principal producto es un combustible limpio para plantas eléctricas.

El proceso de *solvente donador Exxon* que usa un solvente especial para transferir directamente el hidrógeno al carbón. El gobierno norteamericano y varias compañías privadas están colaborando en una planta piloto de 240 millones de dólares que estará lista poco después de 1980. Los

productos incluyen una fracción pesada de nafta y un aceite combustible (fuel-oil) bajo en azufre

El proceso *carbón-H*, en el que el carbón, el solvente, el hidrógeno y un catalizador reaccionan juntos en un recipiente especial. Resultado: petróleo crudo sintético o aceite combustible bajo en azufre

El proceso de *hidrocraqueo de cloruro de zinc*, en el cual el carbón es convertido en gasolina en un simple paso, usando un catalizador de cloruro de zinc. La idea, originaria de Japón durante la segunda guerra mundial, ha sido refinada en Estados Unidos por la firma Conoco. Produce una variedad de productos que van desde coque, nafta, hasta el aceite combustible.

El proceso *Mobil* usa la ruta de síntesis para producir gasolina a partir del carbón, pasando ya sea por el paso normal de gas productor o por la vía del metanol. El producto final tiene un grado de octanaje alto y está libre de fracciones pesadas, por lo que no requiere una refinación costosa.

El proceso *COED* se basa en la pirolisis (combustión en ausencia de aire) para convertir el carbón en coque, alquitrán, gas y petróleo sintético. El proceso es versátil y puede utilizar una amplia variedad de carbones. Una modificación convierte el coque en un sustituto del gas natural y ha sido seleccionada por el gobierno de Estados Unidos para una planta piloto.

Por otra parte, Gran Bretaña, que espera ser virtualmente autosuficiente en petróleo durante los novecientos ochenta, está adoptando un enfoque más a largo plazo que Estados Unidos sobre el petróleo del carbón. Dos rutas se están promoviendo:

El proceso de *solvente líquido del NCB* (National Coal Board), el que es una especie de híbrido entre los procesos SRC y Exxon. Ha sido diseñado principalmente para producir primordialmente materias primas para la industria química (Cf *Turrialba* 29: 173), pero también puede rendir gasolina y querosene para aviones a chorro.

El proceso de *gas supercrítico NCB*, que utiliza los poderes solventes especiales de un gas (en este caso, el tolueno) a presiones y temperaturas por encima del punto crítico, el punto en el cual los líquidos y los gases pierden su distinción. Los productos resultantes incluyen materias primas para las industrias petroquímicas y una variedad de combustibles líquidos.

En un reciente comentario (*Turrialba* 29: 173), nos hemos ocupado de la obtención de materias primas para las industrias petroquímicas, tanto del carbón como de biomasa, después de habernos ocupado varias veces de la búsqueda de sustitutos de la gasolina a partir de productos agrícolas (Cf *Turrialba* 26:219; 27: 226; 28:121). Vemos ahora que el carbón se está considerando en este momento como la fuente más económica para lograr sustitutos de la gasolina. Esto puede ser interesante para aquellos países que tienen grandes yacimientos de este mineral.

Los automóviles del futuro funcionarán perfecta y adecuadamente con gasolina hecha de carbón, y con alcohol en otras regiones. El combustible obtenido del carbón será parecido a la gasolina de grado dos estrellas (esto es, de 91 a 93 octanos). Será también más aceptable desde el punto de vista ambiental porque no necesitará aditivos tales como el plomo tetraetil.

Pero ¿a qué precio... y cuándo? La planta de Sasol, de 24 años, produce gasolina, puesta en fábrica, a 50 centavos de dólar por galón americano (3,785 litros). La planta sudafricana, sin embargo, está asentada sobre un yacimiento gigantesco de carbón, por lo que su economía no se puede aplicar a otras partes. El carbón cuesta en Estados Unidos US\$ 20 la tonelada métrica (comparado con US\$ 40 en Europa) de tal manera que la licuefacción del carbón debería ser ya económica allí. Pero, parece que no hay prisa de parte de las compañías mineras, quizás porque las plantas de licuefacción de carbón cuestan cinco veces más que las refinerías más complejas de petróleo.

El tiempo, sin embargo, está de parte del carbón. Un aumento de 80 por ciento en el precio del petróleo crudo (a US\$ 40 el barril) harían económica la licuefacción a los precios actuales. El carbón está destinado a ponerse más caro, pero los pronósticos son de que el precio del petróleo se elevará mucho más rápido.

El fotoperíodo y la producción de carne

Investigaciones recientes sugieren que los ganaderos pueden aumentar dramáticamente la carne producida por el ganado cambiando los períodos de luz y oscuridad que conforman su día. Hasta ahora los agrónomos han conocido tal efecto sólo en gallinas, las que ponen un número máximo de huevos con un "día" de 14 a 16 horas.

Investigadores en el Dairy Science Department en la Universidad del Estado de Michigan compararon las tasas de crecimiento de invierno del ganado expuesto a un largo día natural de 9 a 12 horas con aquellos mantenidos a un régimen de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. El ganado expuesto al fotoperíodo de 16 horas mostró ganancias diarias de peso que eran 10 por ciento más grande que las de los testigos. Esto en sí mismo sería de importancia comercial al ganadero, pero los investigadores estuvieron agradablemente sorprendidos al hallar que el ganado produjo esa carne extra sin comer más alimento (*Science*, Vol. 199, p. 911).

Los resultados de un estudio similar, esta vez con corderos en crecimiento, han sido publicados por el Departamento de Fisiología y Nutrición Animal de la Universidad de Leeds, en Inglaterra (*Animal Production*, vol. 29, p. 33). Otra vez en este caso los días más largos estimularon el crecimiento tanto en corderos con dieta restringida como cuando se les permitía comer lo que ellos quisieran. Además, las canales más pesadas eran de calidad similar a aquellas de los corderos testigos; en otras palabras, la carne extra no era sólo grasa.

El ganado lechero respondió en forma similar al ganado de engorde. El grupo de Michigan ha demostrado que si las vacas reciben 16 horas de luz, ellas darán 10 por ciento más leche durante los primeros 60 días de lactancia que la que darían si estuvieran expuestas al fotoperíodo natural del invierno.

Publicaciones

Science 80. En la búsqueda de una nueva revista de ciencias que llene la brecha entre el fenomenal éxito de *Omni*, publicada por Bob Guccione, y *Scientific American*, la Asociación Americana para el Avance de la Ciencia ha iniciado la publicación *Science* 80, un título terrible que es lo peor de lo que, mirándolo bien, es una excelente revista.

El primer número contiene artículos buenos y variados: sobre Saturno, sobre los esquistos de Canadá, sobre los péptidos del cuerpo humano, y otro sobre una especie de Stonehenge norteamericano. Tiene además contribuciones de columnistas, páginas en colores, y hasta algunas buenas caricaturas. En este esfuerzo, la AAAS ha batido a Life-Time Inc, que hace ocho años está preparando una revista similar.

Omni, a pesar de la calidad de algunos de sus artículos, carece todavía de respetabilidad, parcialmente gracias a la ciencia ficción que contiene, y quizás también, a su conexión con *Penthouse Scientific American*, por otra parte, se ha vuelto tan aburrida que ya se dice que es "la más comprada y menos leída" publicación científica del mundo. *Science* 80 puede llegar a llenar muy bien esa brecha y convertirse en un notable éxito.