

DIFERENÇAS NO PADRÃO DE ATIVIDADE DE POLIFENOLOXIDASE DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO GRÃO EM CINCO CULTIVARES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)

Cristine E. Alvarenga Carneiro¹; Kátia F. Fernandes²; Maria José Del Peloso³ e Geraldo Estevam de Souza Carneiro⁴

A enzima polifenoloxidase (PPO - 1.14.18.1) é amplamente distribuída na natureza em frutas e em vegetais e tem sido muito estudada. Seu nome comum é polifenoloxidase mas pode ser denominada como oxigenase, tirosinase, fenolase, monofenoloxidase, diidroxifenilalanina e o-difenolase. A PPO pertence à classe de enzimas oxiredutases, que catalisa a oxidação de substâncias fenólicas na presença de oxigênio molecular. Contendo um átomo de cobre como grupo prostético, geralmente encontra-se em atividade em cloroplastos e mitocôndrias. Porém sua localização na planta depende da espécie, idade e maturidade. Com o amadurecimento das plantas há um decréscimo em sua atividade (Espín et al., 1998; Vigny-Vámos, 1981; Jiménez & Carmona, 1996). A PPO está ligada a processos metabólicos de natureza atemporal, como o sistema de transporte de elétrons e a formação de intermediários do metabolismo secundário. Embora o papel da PPO nos vegetais seja controvertido, esta enzima está associada à resistência ao ataque de microorganismos, pois, de um modo geral, as o-quinonas produzidas pela oxidação dos compostos são tóxicas (Ferri, 1985; Bewley & Black, 1978). É também responsável pelo processo de pigmentação de vertebrados e do escurecimento em vegetais, através de oxidação de compostos fenólicos a o-quinonas com conseqüente polimerização das o-quinonas, por reação não enzimática obtendo-se substâncias coloridas (Ohnishi & Matsubara, 1996; Vigny-Vámos, 1981).

Dentre as classes de feijão consumidas no Brasil, destaca-se a de cores, principalmente os feijões de tegumento bege com rajas marrons, comumente denominados de carioca. A preferência é pela cultivar que apresenta tegumento claro, chamado de carioca "leite" e que permaneça claro após o armazenamento. O escurecimento do grão, antes e após a colheita influi na aceitação comercial. Este escurecimento é um fator irreversível, tendo várias causas como reações químicas, enzimáticas e não enzimáticas.

Dada a importância do feijão na alimentação humana, o presente trabalho objetivou medir a atividade da enzima PPO no tegumento do grão durante o seu desenvolvimento em cinco cultivares de feijão contrastantes quanto a cor do tegumento, a fim de se estabelecer uma correlação entre a atividade e o possível papel desempenhado por essa enzima no metabolismo do grão e nas suas características morfológicas, principalmente cor do tegumento.

¹ Química, B.Sc., Estagiária da Embrapa Arroz e Feijão, Caixa Postal 179, 75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO. E-mail: cnpaf@cnpaf.embrapa.br.

² Prof. Titular, M.Sc., Universidade Federal de Goiás (UFG), Depto. Ciências Biológicas, Caixa Postal 131, 74001-970, Goiânia, GO. E-mail: katia@icb2.ufg.br.

³ Pesquisador, Dr., Embrapa Arroz e Feijão.

⁴ Pesquisador, M.Sc., Embrapa Arroz e Feijão.

Foram utilizados grãos das cultivares Ouro Branco (Lu = 71), IAC Carioca Aruã (Lu = 54), Pérola (Lu = 54), Carioca (Lu = 52), Aporé (Lu = 48). Os valores de Lu referem-se à luminosidade medidos em colorímetro pelo sistema Hunter D65, que correlaciona com a cor do tegumento, sendo mais claro o tegumento do grão quanto maior o valor de Lu. As cultivares foram semeadas em casa de vegetação da Fazenda Experimental da Embrapa Arroz e Feijão, situada em Santo Antônio de Goiás, GO, no mês de novembro de 1998, onde a temperatura média foi de 27°C e umidade relativa de 75%. Foram feitos tratamentos fitossanitários para controle de doenças (mofo branco e oídio), e de praga (mosca branca). Os grãos foram colhidos a partir do quinto dia após a abertura da flor e seqüencialmente a cada cinco dias até completar a maturação dos grãos (num total de seis colheitas), sendo transportados até o laboratório em recipiente resfriado com temperatura média de 4°C. Em cada colheita foi medido o tamanho da vagem.

A enzima foi extraída usando sacarose e tampão fosfato segundo Halpin & Lee (1987) com algumas modificações. As vagens das cultivares foram abertas e retirados os grãos, separando rapidamente o tegumento para obter uma amostra de 100mg. Em um tubo adicionou-se 2ml de tampão fosfato de sódio 0,05mol/L, contendo 0,4 mol/L de sacarose (pH 6,5) gelado. Em seguida, cada amostra triplicada foi macerada durante dois minutos, levada ao agitador a 4°C durante 40 minutos, e centrifugada a 20.000 RPM durante 30 minutos a 4°C.

A atividade da PPO foi medida segundo procedimento descrito por Halpin & Lee (1987), usando catecol como substrato. Num procedimento padrão foram usados 2,8 ml de catecol 46 mmol/L preparado em tampão Mellvaines pH 6,5 e 200 µL de amostra. A mistura foi deixada reagir durante um minuto e a absorbância medida a 420 nm. Uma unidade de enzima foi definida como um aumento de 0,1 na absorbância a 420nm por minuto.

O tamanho das vagens por ocasião das colheitas dos grãos variou de 2,9 a 12 cm aos 5 e 30 dias após a abertura da flor (Tabela 1).

Tabela 1. Tamanho (cm) da vagem considerando seis estádios de desenvolvimento da vagem em dias após abertura da flor (daf).

Estádio (daf)	Tamanho (cm)
5	2.9 ± 0.14
10	8.5 ± 0.70
15	10.0 ± 0.70
20	11.5 ± 0.35
25	12.0 ± 0.35
30	12.0 ± 0.49

Os resultados sugerem a existência de pelo menos dois grupos de cultivares, de acordo com a quantidade de PPO produzida (Tabela 2). No primeiro grupo estão as cultivares Ouro Branco, Aruã e Carioca cuja produção inicial de PPO é alta, porém as cinéticas de desaparecimento são bastante diferentes. Em Ouro Branco e Aruã a enzima parece desempenhar papel constitutivo, pois está presente durante todo o desenvolvimento do grão, enquanto na Carioca a enzima parece ter ação em estágio específico, com altos níveis logo nos primeiros dias após a queda da flor.

No segundo grupo estão as cultivares Pérola e Aporé, cujos níveis de PPO são baixos e com aparente ação em estágio específico; em Aporé há um segundo pico de atividade no 20o dia após a abertura da flor.

A análise dos dados permitiu inferir que a enzima PPO atua em diferentes estádios nas cultivares estudadas. Naquelas com baixa taxa de escurecimento do grão após colheita (grupo 1) a enzima tem papel constitutivo e portanto deve estar relacionada primordialmente com processos metabólicos, tais como respiração celular e produção de compostos metabólicos secundários. Já no grupo 2, relacionado às cultivares Pérola e Aporé, a ação da PPO em estágio específico pode estar relacionada com a produção de melaninas.

Tais resultados, entretanto, necessitam ser aprofundados em busca de correlação com o teor protéico, polifenóis e resistência/susceptibilidade desses cultivares ao ataque de insetos e microorganismos.

Tabela 2. Atividade enzimática (U/mL) no tegumento do grão em cinco cultivares de feijão considerando seis estádios de desenvolvimento da vagem em dias após a abertura da flor (daf).

Cultivar	Estádios (daf)					
	5	10	15	20	25	30
Ouro Branco	15,65	15,20	15,30	15,50	15,95	12,40
Aruã	17,20	7,00	6,65	3,95	0,80	0,85
Carioca	17,50	7,85	0	0	0	0
Pérola	8,55	0	0	0	0	0
Aporé	8,10	0	0	11,80	0	0

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ESPÍN, C.J.; TUDELA, J.; CÁNOVAS, G.F. 4 - Hydroxyanisole: The most suitable monophenolic substrate for determining spectrophotometrically oxidize from fruits and vegetables. *Analyt. Biochem.* 259, p.118-126, 1998.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. *Physiology and biochemistry of seeds*. New York: Springer Verlag, 1978.
- FERRI, G.M. *Fisiologia vegetal*. Pedagógica e Universitária, 1979.
- CIAT. *Frijol: investigación y Producción*, 1985.
- JIMÉNEZ, M.; CARMONA, F.G. Kinetics of the slow pH - Mediated transition of polyphenol oxidase. *Arch. Biochem. Bioph.*, v.33, p.15-22, 1996.
- OHNISHI, M.; MATSUBARA, T. Complex formation between sugarligants and catechol: studies on the fluorescence titration with TNS and its effect on the polyphenol oxidase - catalyzed browning reaction, *Starch/Stark*, v.48, n.6, p.233-238.
- VIGYÁZÓ-VÁMOS, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Critical Rev. Food Sci. Nut.*, v.20, p.49-127, 1981.
- HALPIN, B.E.; LEE, C.Y. Effect of blanching on enzyme activity and quality changes in green peas. *J. Food Sci.*, v.52, p.1002-1005, 1987.