

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE POLIFENOLOXIDASE DE FEIJÃO (*PHASEOLUS VULGARIS L.*)¹

Maria Regina Araújo GOMES², Maria Goreti de Almeida OLIVEIRA^{2,3}, *

Geraldo Estevam Souza CARNEIRO⁴, Everaldo Gonçalves de BARROS^{2,5}, Maurílio Alves MOREIRA^{2,3}

RESUMO

As atividades de polifenoloxidasas do feijão (*Phaseolus vulgaris L.*), cultivares: (Aruã, Aporé, A774, Carioca, Diamante Negro, Ouro Branco, Pérola, RAO 33 e Rudá) foram investigadas sob condições de cinética enzimática. O pH ótimo para o extrato bruto das nove cultivares foi em pH 7,2 utilizando catecol como substrato. Nenhuma atividade PPO foi observada na presença do ácido gálico ou D,L-DOPA.

Palavras-chave: ácido gálico; catecol; D,L-DOPA; feijão; pirogalol; polifenoloxidase.

SUMMARY

PHYSICAL CHEMICAL PROPERTIES OF POLIPHENOLOXIDASE FROM BEANS (*Phaseolus vulgaris L.*). The polyphenoloxidase activity of nine bean (*Phaseolus vulgaris L.*) cultivars (Aruã, Aporé, A774, Carioca, Diamante Negro, Ouro Branco, Pérola, RAO 33 e Rudá) were studied. The crude enzyme extract of the nine cultivars was found to have optimum pH in 7.2 using catechol as substrate. No PPO activity in beans (*Phaseolus vulgaris L.*) was observed using D,L DOPA and gallic acid as substrate.

Keywords: gallic acid; catechol; D,L-DOPA; beans; pyrogallol; polifenoloxidase.

1 – INTRODUÇÃO

Polifenoloxidasas (EC. 1.14.18.1), PPO, também conhecidas como tirosinases, cresolases, catecolases, difenolases e fenolases são enzimas intracelulares que ocorrem em plantas, animais e fungos [8,9]. Estas enzimas contêm cobre no centro ativo e catalisam dois tipos de reações, ambas envolvendo oxigênio. A primeira reação corresponde à hidroxilação de monofenóis formando orto-difenóis e a segunda à oxidação de orto-difenóis formando orto-quinonas. As polifenoloxidasas atuam sobre uma grande variedade de substratos. Cita-se *p*-cresol, tirosina e ácido *p*-cumárico como substratos monofenólicos, enquanto catecol, diidroxifenilalanina e ácido clorogênico substratos difenólicos [6].

As polifenoloxidasas estão envolvidas no escurecimento de frutas, vegetais, cereais e leguminosas.

¹ Recebido para publicação em 21/07/00. Aceito para publicação em 06/04/01.

² Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária- BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP 36571-000, Viçosa, MG, Brasil.

³ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, DBB/UFV.

⁴ EMBRAPA Arroz e Feijão, Cx. Postal 179, CEP 75375-000, Santo Antônio de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

⁵ Departamento de Biologia Geral, DBG / UFV.

* Enviar correspondência para malmeida@mail.ufv.br

Muitos métodos têm sido utilizados numa tentativa de prevenir este indesejável escurecimento enzimático [1,2,4].

As reações enzimáticas que envolvem a polifenoloxidase ocorrem no alimento durante o processamento e armazenamento e têm sido muito estudada em frutas e vegetais. No entanto, poucos estudos têm sido realizados com sementes de leguminosas, especialmente o feijão [3,5].

A aceitabilidade de uma variedade de feijão está diretamente ligada ao sabor, a cor e ao tempo de cozimento do feijão e as alterações destas propriedades são provenientes de reações químicas e/ou enzimáticas.

O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito de alguns substratos e do pH na atividade de polifenoloxidase de nove cultivares de feijão buscando determinar o pH e o substrato a serem utilizados em trabalhos posteriores.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Material

As amostras de feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) cultivares (Aruã, Aporé, A774, Carioca, Diamante Negro, Ouro Branco, Pérola, RAO 33 e Rudá) foram obtidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO/CNPAF), localizada em Goiânia-GO, e colhidas em março de 1999.

De um total de um quilo de feijão, amostrou-se aleatoriamente 150 gramas, o qual foi moído em moinho de faca com peneira de abertura de 1mm e homogeneizada devidamente para evitar segregação das cascas e armazenadas a -30°C.

Os substratos utilizados foram obtidos da Sigma Chemical, St. Louis, Mo. Todos os demais reagentes foram de grau analítico.

As amostras foram analisadas em três repetições.

2.2 – Métodos

2.2.1 – Extração da Enzima

Farinha de feijão com casca (2g) foram homogeneizadas em 10mL tampão fosfato de sódio, 0,1M, pH 7,0 por 30 minutos a 4°C. O extrato foi centrifugado a 21500xg durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi centrifugado a 21500xg durante 15 minutos a 4°C, filtrado e utilizado nas determinações da atividade de polifenoloxidase e concentração de proteína.

2.2.2 – Determinação da Atividade de Polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase foi determinada a temperatura ambiente pela adição de 0,93mL de solução de substrato preparado em soluções tampão fosfato de sódio 0,1M em valores de pH variando de 6,4 a 8,0 e 0,07mL do extrato enzimático. Ao branco, foi adicionado 0,93mL de solução de substrato preparado em soluções tampão fosfato de sódio 0,1M em valores de pH variando de 6,4 a 8,0 e 0,07mL do tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0.

As absorvâncias foram determinadas a 420nm a cada 15 segundos por um período de 4 minutos. Os resultados foram expressos em atividade específica ($A_{420} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$).

2.2.3 – Determinação da Proteína

A concentração de proteína no extrato enzimático foi determinada pelo método espectrofotométrico de WARBURG e CHRISTIAN [7].

2.2.4 – Determinação da Especificidade da PPO por Substratos Fenólicos.

Os substratos utilizados na determinação da atividade de polifenoloxidase foram: ácido gálico (10mM, $\lambda = 360\text{nm}$), catecol (80mM, $\lambda = 420\text{nm}$), D,L-DOPA, dihidroxifenilalanina, (10mM, $\lambda = 475\text{nm}$) e piragalol (10mM, $\lambda = 450\text{nm}$). Os substratos foram preparados no momento da análise para prevenir a auto oxidação dos mesmos, em tampão fosfato de sódio, 0,1M, com pH variando de 6,4 a 8,0.

2.2.5 – Efeito do pH sobre a Atividade de PPO

O efeito do pH na atividade de polifenoloxidase foi determinado utilizando-se solução de catecol 80mM em tampão fosfato de sódio, 0,1 M, com pH variando de 6,4 a 8,0, através do incremento de 0,2 unidades em cada determinação.

2.2.6 – Efeito do pH e do Tempo na Oxidação dos Substratos

Os substratos ácido gálico (10mM, $\lambda = 360\text{nm}$), catecol (80mM, $\lambda = 420\text{nm}$), D,L-DOPA (10mM, $\lambda = 475\text{nm}$) e piragalol (10mM, $\lambda = 450\text{nm}$), foram preparados em tampão fosfato de sódio, 0,1M, pH 5,0; 6,0; 7,0; e 8,0. A mistura foi agitada por 10 minutos a temperatura ambiente e as absorvâncias foram registradas a cada 1 minuto por um período de 30 minutos. Ao branco foi adicionado tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras de 1 a 9 apresentam a atividade de polifenoloxidase sobre catecol, em função do pH para as nove cultivares de feijão. O pH ótimo para a atividade de máxima de polifenoloxidase foi em pH 7,2 para todas as cultivares.

O perfil de atividade específica de PPO, sobre catecol, dos cultivares de feijão aruã, aporé, A 774, carioca, diamante negro, ouro branco, pérola, RAO 33 e rudá foram bastante semelhantes.

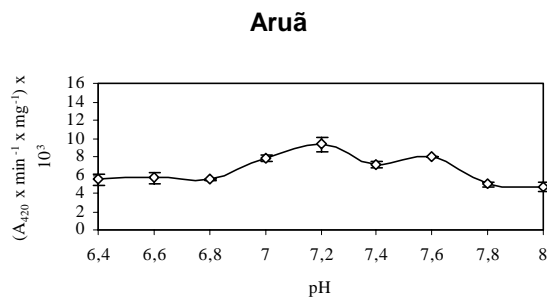


FIGURA 1. Efeito do pH na atividade específica de PPO em extratos de feijão cultivar aruã. Substrato: catecol 80mM.

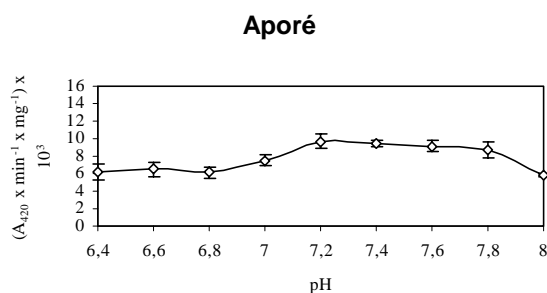


FIGURA 2. Efeito do pH na atividade específica de PPO em extratos de feijão cultivar aporé. Substrato: catecol 80mM.

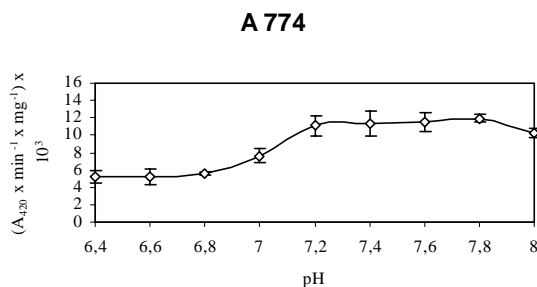


FIGURA 3. Efeito do pH na atividade específica de PPO em extratos de feijão cultivar A 774. Substrato: catecol 80mM.

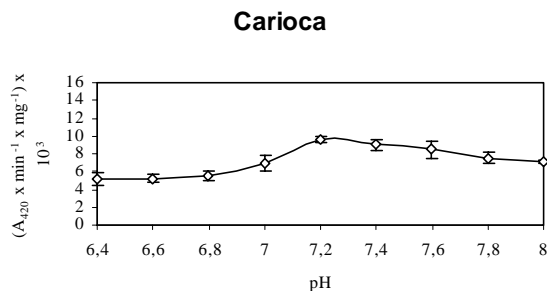


FIGURA 4. Efeito do pH na atividade específica de PPO em extratos de feijão cultivar carioca. Substrato: catecol 80mM.

Diamante Negro

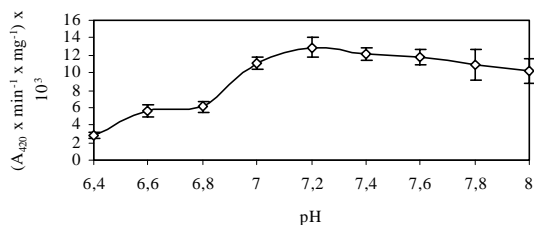


FIGURA 5. Efeito do pH na atividade específica de PPO em extratos de feijão cultivar diamante negro. Substrato: catecol 80mM.

Ouro Branco

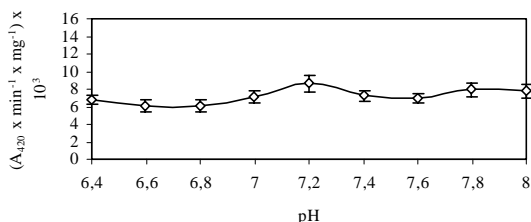


FIGURA 6. Efeito do pH na atividade específica de PPO em extratos de feijão cultivar ouro branco. Substrato: catecol 80mM.

Pérola

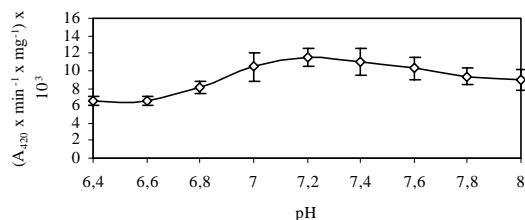


FIGURA 7. Efeito do pH na atividade específica de PPO em extratos de feijão cultivar pérola. Substrato: catecol 80 mM.

RAO 33

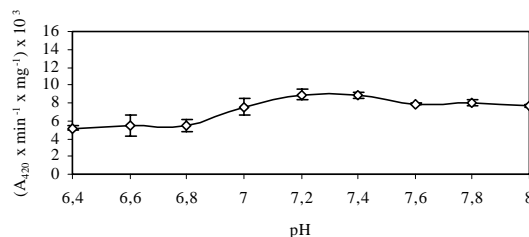


FIGURA 8. Efeito do pH na atividade específica de PPO em extratos de feijão cultivar RAO 33. Substrato: catecol 80mM.

Rudá

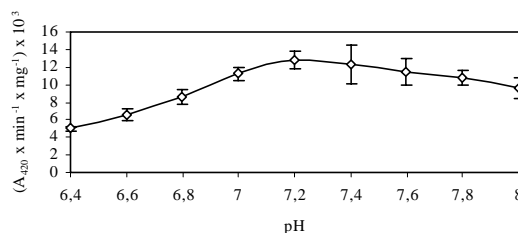


FIGURA 9. Efeito do pH na atividade específica de PPO em extratos de feijão cultivar rudá. Substrato: catecol 80 mM.

A Tabela 1 apresenta os valores de atividade específica de PPO sobre catecol e pirogalol em pH 6,8 e 7,0 para as cultivares diamante negro, ouro branco e rudá. O maior aumento de atividade específica de polifenoloxidase, sobre o substrato pirogalol em pH 7,0, pode ser atribuído ao fato de que ambas as enzimas polifenoloxidase e peroxidase existentes no extrato bruto podem utilizar o pirogalol como substrato. Nenhuma atividade de polifenoloxidase foi observada na presença dos substratos ácido gálico e D,L-DOPA.

TABELA 1. Atividade específica de polifenoloxidase em cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), com diferentes substratos.

pH	Diamante Negro				Ouro Branco				Rudá			
	Ácido Gálico	Catecol	D,L-DOPA	Pirogalol	Ácido Gálico	Catecol	D,L-DOPA	Pirogalol	Ácido Gálico	Catecol	D,L-DOPA	Pirogalol
	(A ₃₆₀ x min ⁻¹ x mg ⁻¹) x 10 ³	(A ₄₂₀ x min ⁻¹ x mg ⁻¹) x 10 ³	(A ₄₇₅ x min ⁻¹ x mg ⁻¹) x 10 ³	(A ₄₅₀ x min ⁻¹ x mg ⁻¹) x 10 ³	(A ₃₆₀ x min ⁻¹ x mg ⁻¹) x 10 ³	(A ₄₂₀ x min ⁻¹ x mg ⁻¹) x 10 ³	(A ₄₇₅ x min ⁻¹ x mg ⁻¹) x 10 ³	(A ₄₅₀ x min ⁻¹ x mg ⁻¹) x 10 ³	(A ₃₆₀ x min ⁻¹ x mg ⁻¹) x 10 ³	(A ₄₂₀ x min ⁻¹ x mg ⁻¹) x 10 ³	(A ₄₇₅ x min ⁻¹ x mg ⁻¹) x 10 ³	(A ₄₅₀ x min ⁻¹ x mg ⁻¹) x 10 ³
6,8	ND	6,08 ± 0,62	ND	6,39 ± 0,25	ND	6,10 ± 0,76	ND	6,39 ± 0,71	ND	8,62 ± 0,84	ND	8,66 ± 1,03
7,0	ND	11,10 ± 0,64	ND	14,17 ± 0,04	ND	7,12 ± 0,64	ND	12,05 ± 0,78	ND	11,25 ± 0,77	ND	16,40 ± 0,44

ND: não detectado
± : desvio padrão da média

Ácido Gálico 10mM

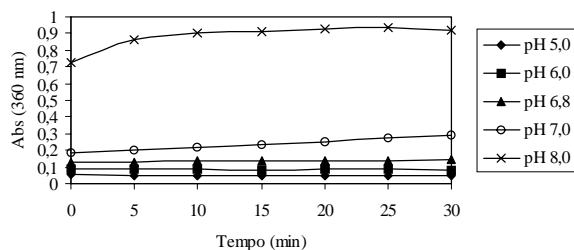


FIGURA 10. Efeito do pH e do tempo na oxidação da solução de ácido gálico.

Catecol 80mM

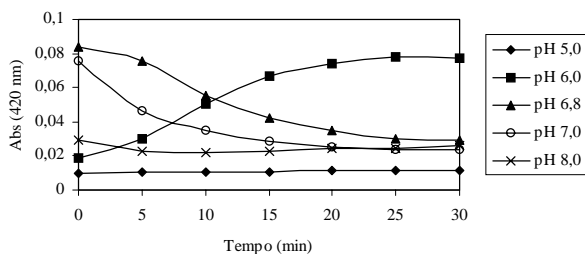


FIGURA 11. Efeito do pH e do tempo na oxidação da solução de catecol.

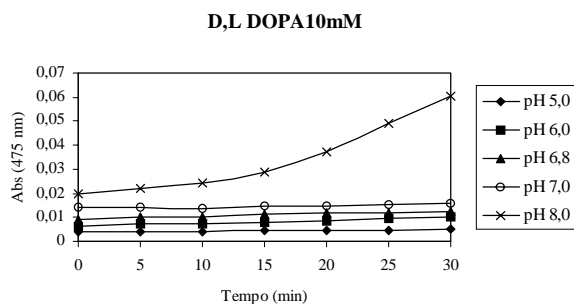


FIGURA 12. Efeito do pH e do tempo na oxidação da solução de D,L-DOPA.

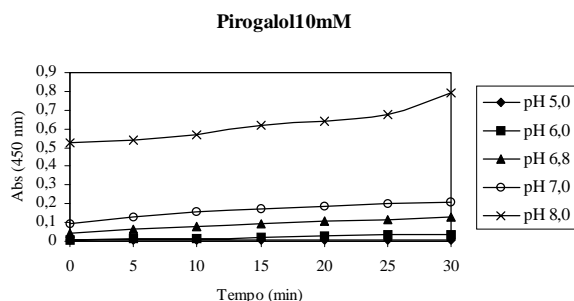


FIGURA 13. Efeito do pH e do tempo na oxidação da solução de pirogalol.

As Figuras de 10 a 13 apresentam o efeito do pH e do tempo na oxidação dos substratos: ácido gálico, catecol, D,L- DOPA e pirogalol.

Na Figura 10 verifica-se que a oxidação do ácido gálico em pH 5,0 e pH 6,0 é lenta e praticamente constante com o tempo. Em pH 6,8, ocorreu um ligeiro aumento nas absorvâncias em função do tempo. Em pH 5,0, 6,0 e 6,8 não houve mudança de cor e todas as três soluções permaneceram incolores durante 30 minutos de leitura. Quando o ácido gálico foi preparado em pH 7,0 a solução apresentou-se incolor e após 30 minutos a solução evoluiu para uma coloração esverdeada bem clara. Em pH 7,0 o ácido gálico oxidou-se rapidamente com o tempo. Em pH 8,0 a solução de ácido gálico apresentou coloração verde após ter sido preparada e mudou para verde-azulado após 30 minutos de leitura. O ácido gálico oxidou-se muito rapidamente com o tempo em pH 8,0.

Observa-se através da Figura 11 um aumento crescente nas absorvâncias em pH 6,0 para a solução de catecol. Em pH 6,0 a solução de catecol mudou de incolor para amarelo claro após 30 minutos de leitura. Um evidente decréscimo nas absorvâncias foi verificado, quando a solução de catecol foi preparada em pH 6,8 e pH 7,0 e em ambos pH as soluções mudaram de amarelo-claro para incolor. Estas mudanças de coloração podem ser explicadas pela formação de quinonas pela oxidação das hidroxilas fenólicas do catecol. Em pH 8,0 a solução de catecol apresentou-se incolor após 30 minutos de leitura e uma pequena variação nas absorvâncias foram observadas com o tempo.

Em todos os valores de pH (5,0 - 8,0) não houve mudança de cor na solução de D,L-DOPA. A solução

de D,L-DOPA apresentou-se incolor até 30 minutos de leitura (Figura 12). Além disso, a oxidação da solução de D,L-DOPA foi muito mais lenta do que os outros substratos.

Na Figura 13, verifica-se que a oxidação da solução de pirogalol é crescente com o aumento do tempo e do pH. Em pH 7,0 a solução de pirogalol oxidou-se rapidamente e apresentou coloração amarela após 30 minutos de leitura. Em pH 8,0 a solução de pirogalol apresentou-se alaranjada após ter sido preparada e a intensidade da cor aumentou após 30 minutos de leitura. A oxidação da solução de pirogalol em pH 8,0 foi muito mais rápida do que nos outros pH.

4 – CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostram que o pH ótimo para o extrato bruto das nove cultivares de feijão foi em pH 7,2 utilizando catecol como substrato.

Nenhuma atividade de PPO foi observada na presença de ácido gálico ou D,L-DOPA.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] GOLAN-GOLDHIRSH, A. G.; WHITAKER, J.R. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite, and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, v. 32, p. 1003-1009. 1984.
- [2] GOMES, M. R. A.; LEDWARD, D. A. Effect of high pressure treatment on the activity of some polyphenoloxidases. *Food Chem.*, v. 56, p. 1-5. 1996.
- [3] IADEROZA, M.; SALES, M.; BALDINI, V. L. S.; SARTORI, M. R.; FERREIRA, V. L. P. Atividade de polifenoloxidase e alterações da cor e dos teores de taninos condensados em nove cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) durante o armazenamento. *Colect. ITAL*, Campinas, 19, p. 154-164, 1989.
- [4] SCHWIMMER, S. Food color, the phenolases and undesirable enzymatic browning. In: AVI PUBLISHING Co (Ed.) *Source Book of Food Enzymology*. Westport: Conn, 1981. p. 267-283.
- [5] UDAYASEKHARA RAO, P.; DEOSTHALE, Y. G. Polyphenoloxidase activity in germinated legumes seeds. *J. Food Sci.*, v.52, p. 1549-1551, 1987.
- [6] VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Critic. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 15, p. 49-127, 1981.
- [7] WARBURG O.; CHRISTIAN, W. Isohierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Z.*, v. 310, p. 384-421, 1941
- [8] WHITAKER, J.R. Polyphenol oxidase. In: FENNEMA, O. R. (Ed.) *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. New York : Marcel Dekker Inc, 1994. p. 543-556.
- [9] ZAWISTOWSKI, J.; BILIADERIS, C. G.; ESKIN, N. A. M. Polyphenol Oxidases. In ROBISON, D. S.; ESKIN, N. A. M. (Ed.) *Oxidative Enzymes in Foods*. 1991. p. 217-273.

6 – AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Embrapa – Arroz e Feijão/CNPAF, Goiânia e à FAPEMIG pelos auxílios concedidos.