

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DURANTE O ARMAZEMAMENTO EM  
FEIJÃO- CAUPI**

MARTA SILVA DO NASCIMENTO<sup>1</sup>, ISABELA PEREIRA LIMA<sup>2</sup>; MARCELA ANDRADE CARVALHO<sup>3</sup>,  
NATALIA BOTEGA ALVES<sup>4</sup>, LUCIANE VILELA RESENDE<sup>5</sup>

**RESUMO**

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade enzimática das populações de *Vigna unguiculata* L da espécie feijão-caupi conservadas em banco de germoplasma por meio das isoenzimas esterase e peroxidase. Utilizou-se 16 acessos da espécie feijão-caupi, que foram armazenados em embalagens impermeáveis por um ano, acondicionados em câmara fria e seca. As análises foram realizadas no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e a metodologia de extração enzimática foi baseada no protocolo estabelecido por Alfenas e colaboradores (1991). Realizou-se uma corrida eletroforética vertical em gel de poliácridamida 10% durante 6 horas a 120 volts. A revelação foi feita para os seguintes sistemas enzimáticos: esterase (EST) e peroxidase (P.O) Os acessos 14 e 15 apresentaram uma maior atividade da esterase e os acessos 4, 11, 14 e 16 a maior atividade está na peroxidase. Alterações nos padrões dessas isoenzimas podem ser diretamente correlacionadas com o período de armazenamento, devido o aumento da deterioração das sementes. Comparando as análises das duas isoenzimas, conclui-se que o acesso 14 (Br-17 Gurgueia) apresentou a maior deterioração durante longos períodos de armazenamento, devido a maior atividade nas duas isoenzimas desses períodos, proporcionando, possivelmente, menor capacidade germinativa em relação aos demais acessos.

**Palavras-chaves:** *Vigna unguiculata* L., isoenzimas, sementes, viabilidade, banco de germoplasma.

**INTRODUÇÃO**

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* L. (Walp.)] é uma leguminosa utilizada como alimento básico em várias partes do mundo, devido as suas propriedades nutricionais. É consumido sob as formas de grãos secos e verdes, e seus caules e ramos são usualmente utilizados na alimentação animal (MOHAMMED et al., 2010). Além disso, apresenta uma capacidade satisfatória de se desenvolver em solos de baixa fertilidade, o feijão-caupi é considerado uma opção como fonte de matéria orgânica (OLIVEIRA et al., 2002). Devido a sua rusticidade, a espécie apresenta boa produção de biomassa em condições climáticas que seriam consideradas adversas para outras culturas, como estresses hídricos, térmicos e salinos (OLIVEIRA et al., 2002). Contudo, sob essas condições adversas, a produtividade de grãos fica comprometida, observando-se produtividades em torno de 441 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2008), sendo que, em condições experimentais, são observadas produtividades de grãos secos acima de 3 t ha<sup>-1</sup> (BEZERRA, 1997). Com a expansão do cultivo do feijão-caupi está atrelada ao desenvolvimento tecnológico da cultura, como, por exemplo, a obtenção de sementes com alta qualidade fisiológica que pode se detectada em condições de laboratório por meio de análises enzimáticas. A utilização dessa técnica permite o estudo de variabilidade genética entre indivíduos e análises de qualidade de

---

<sup>1</sup> Mestrando em Biotecnologia, DBV/ UFLA, marta\_sn1@hotmail.com

<sup>2</sup> Graduanda em Agronomia /UFLA isabelailima@hotmail.com

<sup>3</sup> Mestranda em Fitotecnia, :DAG/UFLA, marcellinhaufila@gmail.com

<sup>4</sup> Graduanda em Biologia / UFLA , natalia.b@hotmail.com

<sup>5</sup> Professora Luciane Vilela Resemde, DAG/UFLA : luciane.vilela@dag.ufla.br

sementes, gerando informações importantes para os melhoristas genéticos e especialistas da área de sementes. A área cultivada com essa cultura vem se expandindo nos últimos anos, trazendo problemas relacionados às doenças, principalmente aquelas transmitidas pelas sementes. Nesse sentido, técnicas da biologia molecular para avaliar a qualidade dessas sementes tornam-se necessárias para a seleção dos melhores materiais para o plantio. Diversos marcadores moleculares têm auxiliado na avaliação e caracterização da variabilidade genética das espécies, contribuindo para prevenção de possíveis perdas genéticas. Entre esses marcadores, as isoenzimas estão sendo muito utilizadas para identificação de cultivares e avaliação do processo de deterioração de sementes, aliando praticidade com confiabilidade. Portanto, objetivou-se neste trabalho avaliar a atividade enzimática das populações de feijão-caupi conservadas em banco de germoplasma por meio das isoenzimas esterase e peroxidase.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

As análises foram realizadas no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras, utilizando 16 acessos de feijão-caupi (Tabela 1). As sementes foram armazenadas em embalagem impermeável por um período de um ano e acondicionadas em câmara fria (10°C) e seca.

A caracterização dos padrões enzimáticos das enzimas esterase e peroxidase foi realizada em eletroforese vertical com gel de poliacrilamida a 10%, conforme descrito por Alfenas e colaboradores (1991). Para a extração das enzimas, as sementes foram pulverizadas em moinho a 4 °C com 2% de PVPP (Polivinilpolipirrolidona). Seguido da adição de 300 µL de acetona e 300 µL de água em 100 mg da amostra pulverizada, posteriormente foi centrifugada a 1400 rpm por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante com aspecto oleoso foi descartado. O tamponamento da amostra foi feito com Tris HCl 0,2M pH8 e 1% β-mercaptoetanol (AGUERO, 2002). Em cada amostra foram aplicados 250 µL do tampão, as amostras foram homogeneizadas em vortex e mantido *overnight* a 4 °C. Foram aplicados 60 µL do sobrenadante no gel de poliacrilamida, constituído pelo gel separador 7,5% e gel concentrador 4,5%. O tampão utilizado na corrida foi o Tris-glicina pH 8,9 e a eletroforese foi efetuada a 120 V por 6 horas. A revelação da esterase foi baseada no protocolo de Scandalios (1974) com adaptações, contendo 100 mL de Tris-HCl 0,05 M (pH 7,1), 50 mg de α-naftil acetato, 50 mg de β-naftil acetato e 100 mg de "Fast Blue RR". Os reagentes foram dissolvidos em 6 ml de acetona 50% e misturados na solução pouco antes de serem vertidos sobre o gel. A incubação foi feita por 30 minutos a 37 °C. O gel foi lavado duas vezes em água destilada e escaneado no fotodocumentador Vilber Lourmat. A revelação da Peroxidase (P.O) foi baseada no protocolo proposto por Alfenas e colaboradores (1991). A interpretação dos resultados foi baseada na análise visual dos géis de eletroforese, levando-se em consideração a presença, a ausência e a intensidade das bandas.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Todos os acessos apresentaram atividade de isoenzimas da esterase, contudo, pela intensidade da primeira banda no gel de eletroforese, é possível observar maior atividade nos acessos 14 e 15 (Figura 1). A maior atividade da esterase pode se traduzir em redução da qualidade das sementes, pois a enzima está envolvida em reações de hidrólise de ésteres, estando diretamente relacionado ao metabolismo de lipídios (SANTOS et al., 2004). O alto teor de gordura nas sementes de feijão-caupi pode favorecer essas enzimas hidrolíticas, aumentando a liberação de ácidos graxos dos lipídios, os quais são usados como fonte de energia para os eventos germinativos. Assim, como muitos desses lipídios são constituintes de membranas, a sua deterioração acarreta em redução da qualidade das sementes e, em muitos casos, redução da capacidade germinativa em sementes armazenadas por longos períodos. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Padilha e colaboradores (2001) com sementes de milho, em que a menor intensidade das bandas de esterase foi correlacionada com a redução da qualidade da semente, devido à deterioração e redução da capacidade germinativa. Contudo, a variação no perfil eletroforético da enzima esterase não está necessariamente relacionado ao metabolismo endógeno da semente, pois a mesma pode estar sendo alterada devido à ação de microrganismos (VIEIRA, 1996). A presença ou ausência de bandas no gel de eletroforese também pode ser útil na diferenciação de indivíduos. Nesse sentido, pode-se observar ausência da terceira banda (de cima para baixo) nos acessos 1, 8, 9, 10, 13, 15 e 16 em relação aos demais, indicando que existe diferenças genéticas no loco da enzima esterase. Contudo, não foi possível observar diferenças na intensidade dessas bandas, impossibilitando a diferenciação entre esses materiais. Observou-se uma

**XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA**  
**27 de setembro a 01 de outubro de 2010**

intensidade das bandas na revelação da isoenzima peroxidase, nos acessos 4, 11, 14 e 16 (Figura 2), possivelmente está relacionado com uma maior atividade isoenzimática. A peroxidase está envolvida em diversas reações, ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de patógenos, regulação da elongação de células e outras (Gaspar et al., 1982; Kao, 2003). A queda do desempenho germinativo das sementes devido à redução dessas isoenzimas pode ser atribuída, em grande parte, aos danos ocasionados às membranas mitocôndrias.

A oxidação enzimática de polifenóis pela peroxidase (PER) resulta no escurecimento de tecidos vegetais (Whitehead & Swardt, 1982). Em caso de armazenamento, Canapu Precoce, Ipa 202, Br 14 Gurgueia e o TE 867517 E-2 apresentaram maior escurecimento por apresentar teor mais elevado de polifenóis e maior atividade da PER.

**Tabela 1.** Acessos de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] do banco de germoplasma da Universidade Federal de Lavras.

Nº	Acesso	Nº	Acesso	Nº	Acesso	Nº	Acesso
1	Epace 10	5	BR-14 Mulato	9	Emapa 821 Vita 6	13	IPA 205
2	TE 90180-9F	6	Epace 01	10	IPA 201	14	Br-17 Gurgueia
3	Balinha	7	Canapu	11	IPA 202	15	Vita-3
4	Canapu Precoce	8	BR-9 Longe	12	IPA 204	16	TE867517 E-2

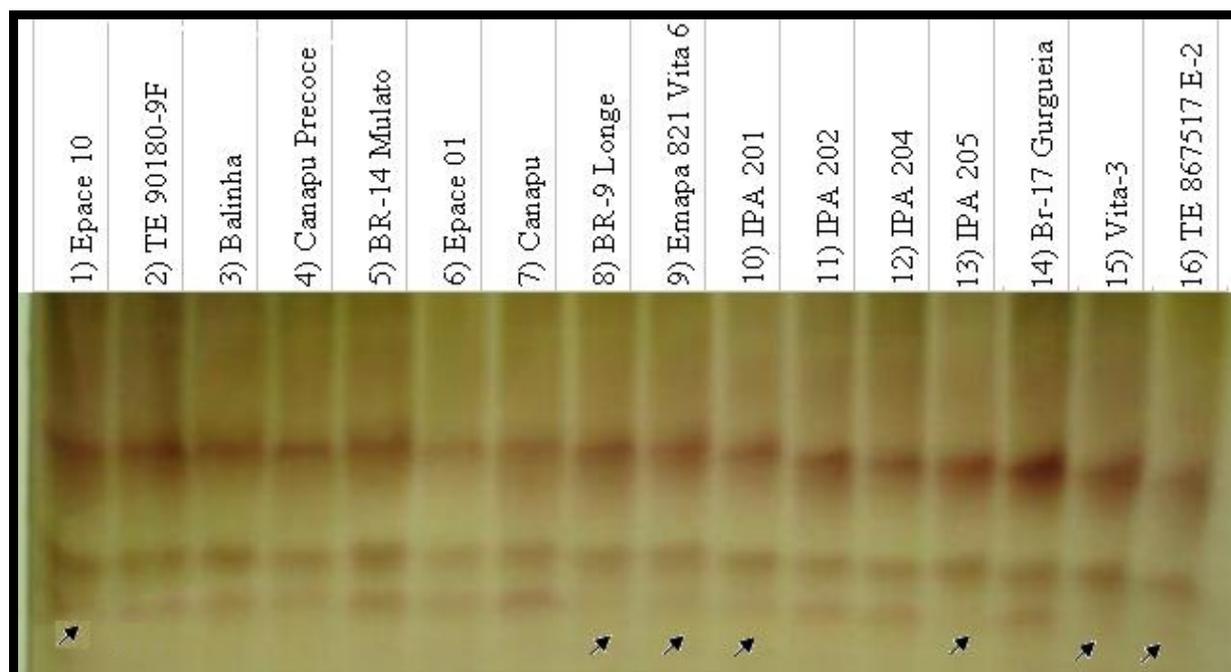


Figura 1. Perfil enzimático da esterase em acessos de feijão-caupi.

**XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA**  
27 de setembro a 01 de outubro de 2010



Fig. 2. Perfil enzimático da peroxidase em acessos de feijão caupi

## CONCLUSÃO

Levando-se em consideração as análises das duas isoenzimas em conjunto, pode-se concluir que o acesso 14 (Br-17 Gurgueia) apresenta a maior deterioração durante longos períodos de armazenamento, devido a maior atividade das duas isoenzimas nesse período, proporcionando, possivelmente, menor capacidade germinativa em relação aos outros acessos.

## REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W. e PASSADOR, G. C. **Eletroforese de Proteínas e Isoenzimas de Fungos e Essências Florestais**. Vicosa, SIF, 1991, 242p.

AGUERO, C.O.P. **Padrões eletroforetico de cultivares de soja** ( Glycine Max (L.) Merril. 2002. 36p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Sementes)- Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BEZERRA, A.A.C. **Variabilidade e diversidade genética em caupi [Vigna unguiculata (L.) Walp.] precoce, de crescimento determinado e porte ereto e semi-ereto**. 1997. 105f. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal Rural de Pernambuco de Recife, Pernambuco.

COUTINHO, W.M; SILVA-MANN, R; VIEIRA, M.G.G.C; MACHADO, C.F; MACHADO, J.C. Qualidade Sanitária e Fisiológica de Sementes de Milho Submetidas a Termoterapia e Condicionamento Fisiológico. **Fitopatologia Brasileira** v.32, p.458-464, 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Avaliação da safra agrícola 2007/2008: quarto levantamento. 2008.

GASPAR, T.H.; PENEL, C.L.; THORPE, T.; GREPPIN, H. **Peroxidasas: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants**. Genève: Université de Genève, 1982. 324p

KAO, C.H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v.39, p.83-89, 2003

**XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA**  
**27 de setembro a 01 de outubro de 2010**

---

MOHAMMED M.S; RUSSOM Z; ABDUL S.D. Inheritance of hairiness and pod shattering, heritability and correlation studies in crosses between cultivated cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) and its wild (var. pubescens) relative. *Euphytica* 171: 397–407.

OLIVEIRA,A.P; TAVARES SOBRINHO J; NASCIMENTO J.T; ALVES A.U; ALBUQUERQUE I.C; BRUNO G.B. Avaliação de linhagens e cultivares de feijão-caupi, em Areia, PB. **Horticultura Brasileira** v.20, p.180-182, 2002.

SANTOS, C.M.R; MENEZES, N.L.; VILELA, F.A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 110-119, 2004.

VIEIRA, M.G.G.C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro** (*Gossypium hirsutum* L.). 1996. 114 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

WHITEHEAD, C. S.; SWARDT, G. H. Extration and activy of poliphenoloxidase and peroxidase from senescing leaves of *Protea nerifolia*. **South African Journal of Botany**, Pretória, v. 1, p. 127-130, 1982.