

Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas

Ângela Diniz Campos¹
Eliana Mariete da Luz Silveira²

A peroxidase é uma importante enzima das plantas (EC 1.11.1.7). 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.

As plantas contêm um número relativamente elevado de isoenzimas de peroxidase, principalmente localizadas nas paredes celulares, as peroxidases aniônicas. As peroxidases catalisam a oxidação do substrato utilizando o poder oxidante do H₂O₂ ou de peróxidos orgânicos. O substrato geralmente é um composto aromático (tirosina, compostos fenólicos, etc), sendo que também podem atuar sobre compostos não aromáticos, como o ácido ascórbico. As isoenzimas diferem em sua afinidade por distintos substratos, porque sua especificidade não é absoluta. Entretanto, o balanço das isoenzimas presentes na parede é muito importante, do ponto de vista da modificação estrutural. Com o aumento da rigidez da mesma, o crescimento diminui e, em contrapartida, aumenta a resistência mecânica e química em condições de estresse.

A velocidade de lignificação do tecido infectado é outro fator muito importante em uma reação de resistência da planta a doenças. A lignificação depende de reações com o envolvimento direto da peroxidase.

A polifenol oxidase (EC 1.10.3.1) com envolvimento na senescência é geralmente alta em tecidos infectados, daí a importância desta enzima para as plantas. A ação da polifenol oxidase processa-se através da hidroxilação de monofenóis para o-difenóis e oxidação destes o-difenóis para quinonas. De acordo com Padmaja et al. (1982) e Rickard et al. (1979), os fenóis já presentes nos ferimentos são oxidados para o-quinonas ou polímeros pela ação da polifenol oxidase, havendo estímulo a biossíntese de oxidação destes fenóis e, conseqüentemente, um aumento da atividade desta enzima. As quinonas têm ação antimicrobiana e os polímeros podem atuar como taninos, formando complexos com proteínas que atuam como barreira física para a penetração de patógenos.

A importância da atividade da polifenol oxidase na resistência a doenças provavelmente seja devida à propriedade de oxidar compostos fenólicos para quinonas, que são muito mais tóxicos para microorganismos do que o fenol original. Segundo Agrios (1997) e Zheng-CuiMing et al., (1999), por esta razão, admite-se que um aumento na atividade da polifenol oxidase resulta em altas concentrações de produtos tóxicos de oxidação; portanto, em maior grau de resistência à infecção.

Compostos fenólicos são os substratos utilizados pelas enzimas peroxidase e polifenol oxidase e o produto da oxidação destas enzimas, tidos como potentes bactericidas e fungicidas, são produzidos rapidamente e se acumulam após a infecção, especialmente em variedades resistentes, sendo altamente tóxicos para patógenos. A biossíntese de compostos secundários depende da constituição genética da planta, que determina a formação das enzimas de especialização correspondentes. O emprego da resistência genética tem merecido especial destaque dentro de um sistema integrado de controle, visando à redução de perdas ocasionadas pela doença.

O composto fenólico mais bem caracterizado em feijão por exemplo é a faseolina. É produzido quando as plantas de *Phaseolus vulgaris* são atacadas por fungos.

¹ Eng. Agrôn., PhD. Fisiologia Vegetal, Embrapa Clima Temperado, Cx. Postal 403. CEP 96001-970, Pelotas-RS.

² Téc. em Química da Embrapa Clima Temperado, Cx. Postal 403. CEP 96001-970, Pelotas-RS.

As metodologias para análise de peroxidase e polifenol oxidase foram desenvolvidas no Laboratório de Fisiologia Vegetal Embrapa Clima Temperado, com base nas técnicas descritas por Ponting & Joslyn, 1948; Matsuno & Uritani (1972). As modificações permitem redução na quantidade de reagentes utilizados e, consequentemente, no custo; proporcionam maior confiabilidade nos resultados e reduzem o tempo para as análises.

Preparo das amostras

As folhas congeladas devem ser homogeneizadas à temperatura máxima de 4°C em 10 mL de tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0), contendo 1 mg de polivinilpirrolidona-10. O homogeneizado deve ser filtrado e centrifugado a 4000 g por 20 minutos em refrigeração, e o precipitado sedimentado descartado. O extrato bruto deve ser acondicionado em gelo e, posteriormente, usado como fonte enzimática para peroxidase e para polifenoloxidase. Toda vidraria utilizada na manipulação do extrato deve ser deixada anteriormente em freezer a 18°C negativos, por pelo menos 4 horas. É necessário que estes tubos estejam bem gelados; portanto, devem ser sempre mantidos em banho de gelo durante o processo, para evitar alguma atividade da enzima.

Análise da atividade da polifenoloxidase

Em um tubo, devem ser colocados 3,6 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0; 1 mL do extrato enzimático; 0,1 mL de catecol 0,1 M; em seguida misturados em vortex por quinze segundos. Esta mistura deve ser incubada em banho de água a 30°C, por 30 minutos. Após isto, o tubo contendo a mistura deve ser transferido para um banho de gelo e adicionado de 0,2 mL de ácido perclórico a 1,4%. Após agitação em vortex, o tubo deve ser deixado em repouso por 10 minutos. A leitura de absorvância deve ser realizada em 395 nm, em espectrofotômetro. Como controle para a reação enzimática, o extrato enzimático deve ser substituído por água. A atividade da enzima é expressa em unidade enzimática (UE). Uma unidade da enzima é definida como a quantidade de enzima que causa um aumento de 0,001 unidade por minuto de absorvância.

Análise da atividade da peroxidase

Em um tubo, devem ser colocados 2,5 mL de tampão fosfato-citrato contendo solução de fosfato de sódio dibásico 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M, pH 5,0; 1,5 mL de extrato enzimático; e 0,25 mL de guaiacol a 0,5%, sendo misturados em vortex. Em seguida, deve ser adicionado a esta mistura 0,25 mL de H₂O₂ a 3% e, novamente, misturados em vortex. Esta mistura deve ser incubada a 30°C por 15 minutos. Após a incubação, o tubo deve ser colocado em banho de gelo e ser adicionado a esta mistura 0,25 mL da solução de meta bissulfito de sódio a 2%. Após agitação em vortex, o tubo deve ser deixado

em repouso por 10 minutos. A leitura de absorvância deve ser em 450 nm, em espectrofotômetro. Como controle para a reação enzimática, utiliza-se água. A atividade da enzima é expressa em unidade enzimática (UE). Uma unidade da enzima é definida como a quantidade de extrato enzimático que acusou um aumento na absorvância de 0,001 unidade por minuto.

Bibliografias Consultadas

- AGRIOS, G.N. Plant pathology. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.
- CARDOSO, C.O.N.; GARRAWAY, M.O. Bioassay using phenolic compounds and phytoalexins produced in bean plants infected with *Fusarium solani* f. *phaseoli* (Burk.) Snyd & Hans. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v.3, p.103-116, 1977.
- GASPAR, TH.; PENEL, C.L.; THORPE, T.; GREPPIN, H. Peroxidases, A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. *Univservité de Genève, Genève*, 1982, 324p.
- GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, TH. Molecular and physiological aspects of plant peroxidases. *University of Geneva Switzerland, Genève*, 1986, 469p.
- HARTLEB, H.; HEITEFUSS, R; HOPPE, H. Resistance of crop plants against fungi. *Stuttgart: G. Fischer*, 1997, 544p.
- MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. *Plant and Cell Physiology*, Tokyo, v.13, p. 1091-1101, 1972.
- NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.33, p.603-612, 2001.
- OKEY, E.D.; DUNCAN, E.S.; SIRJU-CHARRAN, G. SREENIVASAN, T.N. Phytophthora canker resistance in cacao: role of peroxidase, poliphenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase. *Phytopathologische Zeitschrift*, Berlin, v.145, n.7, p.295-299, 1997.
- OROBER, M.; SIEGRIST, J.; BUCHENAUER, H.; LYR, H.; RUSSEL, PE.; DEHNE. H.W.; SISLER, H.D. Induction of systemic acquired resistance in cucumber by foliar phosphate application. *Modern fungicides and antifungal compounds II. 12th. INTERNATIONAL REINHARDSBRUNN SYMPOSIUM*, 1999, Thuringia, p. 339-348.

PADMAJA, G.; BALAGOPAL, C.; POTTY, V.P. Polifenoles yel deterioro fisiologico en yucca. Yuca; Boletim Informativo, Cali, v.10, n.5, 1982.

PIÑOL, M.T.; PALAZÓN, J. Metabolismo secundário In: BIETO-AZCON, J.; TALON, M. Fisiologia y bioquímica vegetal. Madri: McGraw-Hill, 1996. p. 273-283.

PONTING, J.D.; JOSLYN, M.A. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. Archives of Biochemistry, New York, v.19, p. 47-63, 1948.

RICKARD, J.E.; MARRIOTT, J.; GAHAN, P.B. Oclusions in cassava xylem vessels associated with vascular discoloration. Annals of Botany, Colchester, v.4, n.43, p.523-526, 1979.

SALIN, M.L.; BRIDGES, S.M. Chemiluminescence in soybean root tissue: effect of various substrates and inhibitors. Photobiochemistry and Photobiophysic, Elmsford, v.6, p.57-64, 1983.

SALIN, M.L.; BRIDGES, S.M. Chemiluminescence in wounded root tissue. Evidence for peroxidase involvement. Plant Physiology, Bethesda, v.67, p.43-47, 1981.

ZARRA, I.; REVILLA, G. Pared celular. Estructura e función. In: AZCON-BIETO, J.; TALON, M. Fisiología y bioquímica vegetal. New York: Interamericana-Mcgraw-Hill, 1996. cap.1, p 1-24.

ZHENG-CUIMING; TENG-BING; GAO-FENGI; WU-ZONGPU; ZHENG-CM; TENG-B; GAO-FL; WU-ZP. Studies on the changes of superoxido dismutase, peroxidase and plipheno oxidase in seed coat of soybeans after infection with Soybean Mosaic Virus. Scientia-Agricultura Sinica, Beijing, v.32, n.1, p.99-101, 1999.

Comunicado Técnico, 87

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

Endereço: Caixa Postal 403

Fone/fax: (53) 275 8199

E-mail: sac@cpact.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2003): 100

Comitê de Presidente: Mário Franklin da Cunha Gastal

Publicações Secretária-Executiva: Joseane M. Lopes Garcia

Membros: Ariano Martins Magalhães Junior, Flávio Luiz Carpena Carvalho, Darcy Bitencourt, Cláudio José da Silva Freire, Vera Allgayer Osório, **Suplentes:** Carlos Alberto Barbosa Medeiros e Eva Choer

Expediente Supervisor editorial: Maria Devanir Freitas Rodrigues

Revisão de texto: Maria Devanir Freitas Rodrigues/Ana Luiza Barragana Viegas

Editoração eletrônica: Oscar Castro