

ESTRESSE OXIDATIVO EM GRÃOS DE FEIJÃO CARIOCA RECÉM-COLHIDOS

OXIDATIVE STRESS IN FRESHLY HARVESTED CARIOCA BEANS (*Phaseolus vulgaris* L.)

Anna Cristina Lanna¹; Rosângela Nunes Carvalho²; Maria Eugênia de Oliveira Ferreira³; Priscila Zaczuk Bassinello⁴; Márcio Caliarí⁵; Gesimária Ribeiro Costa Coelho⁶

Introdução. Nos últimos anos, o Brasil tem ocupado o primeiro lugar na produção e no consumo mundial do feijão comum, que além de se constituir em um dos alimentos básicos da população brasileira, é uma das principais fontes de proteína na dieta alimentar dos estratos sociais economicamente menos favorecidos. Entre os diversos grupos comerciais de grãos de feijão comum, merecem destaque os grãos do grupo carioca, que são os preferidos pela grande maioria dos consumidores e ocupam cerca de 70% do mercado consumidor, conseqüentemente, recebendo maior atenção dos programas de melhoramento. Recentemente, características relacionadas à qualidade comercial dos grãos, como tamanho e cor dos grãos, tempo de cocção e escurecimento/endurecimento dos grãos armazenados, vêm ganhando importância frente a maior exigência dos consumidores. O período de armazenamento pós-colheita de grãos, principalmente em regiões tropicais, é marcado por condições de temperatura, umidade e radiação bem elevadas. Assim, a ocorrência de distúrbios fisiológicos nos grãos armazenados afeta tanto sua qualidade nutricional quanto a comercial. Para a maioria dos genótipos de feijão carioca é comum ocorrer o processo de endurecimento e escurecimento nos grãos, os quais envolvem reações complexas em diferentes partes e componentes moleculares do grão, tais como tegumento e cotilédone; parede celular e lamela média; compostos fenólicos, amido, proteína, enzimas, dentre outros. Como resultado, os grãos de feijão podem sofrer alterações na cor, textura e *flavor*, sendo a cor e a textura atributos mais importantes das sementes leguminosas, uma vez que afeta a aceitabilidade do produto pelos consumidores. A cor está associada à oxidação de compostos fenólicos presentes no tegumento e a textura às características da parede celular do grão, dentre as quais o grau de solubilidade dos polissacarídeos e a despolimerização durante o processo de cozimento são as mais importantes. Atualmente, sabe-se que os processos de escurecimento (cor) e endurecimento (textura) do grão de feijão são caracterizados por múltiplos mecanismos bioquímicos e, possivelmente, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) seja o evento primário para desencadeá-los. As principais EROs distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila (OH[•]), superóxido (O₂^{•-}), peróxila (ROO[•]) e alcóxila (RO[•]); e os não radicalares: oxigênio singlete (¹O₂) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Apesar dos grãos recém-colhidos apresentarem baixa taxa metabólica devido ao reduzido conteúdo de água, a oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e, dessa forma, a produção de radicais livres ocorrem naturalmente. Assim, esse estudo objetivou avaliar o nível de estresse oxidativo em grãos de feijão carioca, recém-colhidos, por meio da determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD), teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e nível de peroxidação de lipídeos (dano de membrana).

Material e Métodos. Foram utilizados os genótipos de feijão comum, grupo comercial carioca, com características contrastantes para escurecimento/endurecimento de grãos: BRS Estilo, BRS

¹Pesquisadora, Área de Fisiologia/Bioquímica Vegetal, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antonio de Goiás, Goiás, Brasil. anna.lanna@embrapa.br;

²Analista, Área de Ciência de Alimentos, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antonio de Goiás, Goiás, Brasil. rosangela.carvalho@embrapa.br;

³Graduanda em Química, IEF-Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil. mariaeugenia@gmail.com;

⁴Pesquisadora, Área de Ciência de Alimentos, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antonio de Goiás, Goiás, Brasil. priscila.bassinello@embrapa.br;

⁵Professor adjunto, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos - PPGCTA-UFG. Goiânia, Goiás, Brasil. macaliari@ig.com.br;

⁶Analista, Área de Biotecnologia, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antonio de Goiás, Goiás, Brasil. gesimaria.coelho@embrapa.br.

Pontal, BRSMG Madrepérola, CNFC 10467 e a linhagem Pinto Beans (Canadá), sendo os dois primeiros sensíveis e os três últimos resistentes ao processo de escurecimento/endurecimento. A linhagem Pinto Beans foi utilizada como controle negativo (Junk-Knievel et al., 2008). Após colheita na Fazenda Capivara da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás/GO, os grãos foram submetidos à secagem natural, beneficiados, acondicionados em sacos de polietileno com capacidade de, aproximadamente, 1 kg, e, em seguida, enviados para o Laboratório de Grãos e Subprodutos da Embrapa Arroz e Feijão. Para o processamento das amostras, 200 g de grãos de cada genótipo foram descascados utilizando brunidor de arroz (TM05C, SATAKE), separados cotilédone e tegumento utilizando peneiras de 9, 14 e 16 mesh, seguida pela moagem e maceração em cadinho, utilizando nitrogênio líquido. A massa de cotilédone e de tegumento de, aproximadamente, $1,5 \pm 0,0003$ g, foi transferida para tubos de centrífuga de 50 mL, adicionados 15 mL de solução 100 mmol L^{-1} de tampão fosfato de potássio, pH 7,8, contendo $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de EDTA, 1% (p/v) de polivinilpirrolidona PVP e 0,5% (v/v) de Triton X-100 e, então, centrifugados a 14.000 g por 40 minutos, a 4°C . O sobrenadante (extrato bruto de cotilédone e de tegumento) foi usado para determinação da atividade de SOD, de acordo com metodologia descrita por Del Longo et al. (1993), do conteúdo de H_2O_2 pelo método descrito por Lee e Lee (2000) e Gilliland (1968) e do nível de peroxidação de lipídeos, de acordo com Hodges et al. (2000); os quais foram avaliados no laboratório de Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão. A atividade de SOD foi expressa como atividade específica (Unidade SOD mg^{-1} de proteína), sendo o conteúdo de proteínas solúveis totais medido de acordo com o método de Bradford (1976), com albumina sérica bovina (BSA) como padrão. O nível de peroxidação de lipídeos ou eq de MDA, expresso em nmol MDA g^{-1} de matéria fresca (MF) de tegumento e de cotilédone. E, para quantificação do conteúdo de H_2O_2 , expresso em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$ de matéria fresca (MF), o extrato bruto foi produzido a partir de 15 mL de solução 100 mmol L^{-1} de tampão citrato de sódio, pH 4,0 e, então, centrifugados a 14.000 g por 40 minutos, a 4°C .

Resultados e Discussão. A detecção da atividade de SOD, em grãos armazenados, sugere que durante armazenamento de grãos de feijão carioca ocorre estresse oxidativo mediado por enzimas antioxidantes, dentre elas SOD. O tegumento de grãos do BRS Pontal, genótipo com escurecimento rápido, apresentou atividade de SOD superior aos demais, seguido pelo tegumento de grãos da linhagem CNFC 10467, BRS Estilo e BRSMG Madrepérola. Enquanto, o genótipo Pinto Beans, considerado resistente ao escurecimento, apresentou atividade de SOD significativamente reduzida, comparativamente, à atividade de SOD dos outros genótipos (Tabela 1). Independentemente do genótipo, a atividade de SOD no cotilédone foi menor que a encontrada no tegumento e, entre os genótipos, houve diferença significativa entre o BRSMG Madrepérola e os demais. Uma maior atividade de SOD, principalmente no tegumento de grãos de feijão carioca, indica formação de EROs com consequente instalação de processos oxidativos, como por exemplo oxidação de compostos fenólicos, durante o armazenamento de grãos. O produto da atividade de SOD, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e seu acúmulo em excesso pode ser uma das principais consequências dos estresses abióticos que ocorrem durante o armazenamento de grãos. EROs são tóxicas quando produzidas em altas concentrações, mas em baixas concentrações, elas agem com um sinal de alerta para dar início às respostas preventivas contra a maioria dos fatores estressantes (Ara et al., 2013). O balanço entre produção de EROS (atividade de SOD) e a degradação das mesmas é crucial em determinar a carga oxidativa do grão. Nesse estudo, verificou-se que o teor de H_2O_2 foi maior no tegumento do genótipo BRS Pontal, pouco resistente ao processo de escurecimento, e no cotilédone dos genótipos BRS Pontal e Pinto Beans (Tabela 1). Esses resultados são consistentes com estudos prévios de deficiência hídrica, salinidade e outros tipos de estresses, os quais relataram que existe uma menor produção de EROS em genótipos tolerantes do que em genótipos sensíveis (Karabal et al, 2000; Chaitanya et al., 2002; Bhoomika et al, 2013). Adicionalmente, uma produção mais alta de EROs em genótipos tolerantes ao escurecimento/endurecimento de grãos, como o Pinto Beans, podem indicar que os mesmos são pouco vulneráveis a altas concentrações de H_2O_2 , ou mesmo, que seu consumo (degradação) pode ocorrer rapidamente após sua produção.

Tabela 1. Parâmetros do estresse oxidativo em grãos de feijão, tipo comercial carioca, recém-colhidos.

Genótipos/ Frações	BRSMG Madrepérola	BRS Estilo	CNFC 10467	BRS Pontal	Pinto Beans
<u>Atividade específica de SOD (Un SOD mg⁻¹ proteína)</u>					
Tegumento	19977,27ab	2641,85ab	3424,46ab	3621,88a	454,72b
Cotilédone	18,76b	50,06a	47,27a	44,11a	58,14a
<u>Peróxido de hidrogênio (nmol g⁻¹ MF)</u>					
Tegumento	14,91b	13,31b	10,76b	50,82a	13,39b
Cotilédone	17,44bc	12,56bc	9,2c	32,92ab	46,68a
<u>Equivalentes MDA (nmol g⁻¹ MF)</u>					
Tegumento	4,45cd	9,85a	6,06bc	3,74d	6,69b
Cotilédone	12,28a	11,82a	12,84a	14,22a	13,63a

Resultados são a média de três repetições. Na linha, médias com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($p > 0.05$). MDA = malonaldeído. MF = matéria fresca.

Adicionalmente, uma produção mais alta de EROs em genótipos tolerantes ao escurecimento/endurecimento de grãos, como o Pinto Beans, podem indicar que os mesmos são pouco vulneráveis a altas concentrações de H₂O₂, ou mesmo, que seu consumo (degradação) pode ocorrer rapidamente após sua produção. Como consequência da geração de H₂O₂, as células estão propensas a sofrerem danos nas membranas celulares do grão de feijão (peroxidação de lipídeos). A extensão da peroxidação lipídica, a qual foi estimada com base no conteúdo de MDA, foi significativamente aumentada no tegumento de grãos do genótipo BRS Estilo, enquanto o nível de peroxidação de lipídeos, no cotilédone, não variou significativamente entre os genótipos (Tabela 1). A peroxidação de lipídeos é um efetivo marcador bioquímico do estresse oxidativo, mediado pelas EROs, em tecidos de plantas lesionados ou sob algum tipo de estresse ambiental. A decomposição de ácidos graxos insaturados gera MDA, o qual é o mais abundante produto aldeídico originado da quebra de lipídeos. A manutenção de baixos níveis de acúmulo de MDA tem sido mostrada estar associada com tolerância ao calor e radiação intensos. Ao contrário, altos níveis de MDA representam mais danos de membrana e menor tolerância aos estresses abióticos (Ara et al., 2013). Peroxidação de lipídeos aumentada tem sido documentada em várias espécies de plantas sob estresse, tais como amora, tomate e ervas (Liu e Huang, 2000; Chaitanya et al., 2002; Camejo et al., 2006; Du et al., 2013).

Conclusão. A maioria dos parâmetros avaliados indicou que o estresse oxidativo ocorre mais acentuadamente nos genótipos mais sensíveis ao processo de escurecimento/endurecimento de grãos, como o BRS Pontal e o BRS Estilo. Isso sugere que estudos mais detalhados precisam ser conduzidos para caracterização do processo oxidativo em grãos de feijão, tipo comercial carioca, nos diferentes genótipos integrantes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Arroz e Feijão.

Referências

ARA, N.; NAKKANONG, K.; LV, W.; YANG, J.; HU, Z.; ZHANG, M. Antioxidant enzymatic activities and gene expression associated with heat tolerance in the stems and roots of two cucurbit species (“*Cucurbita maxima*” and “*Cucurbita moschata*”) and their interspecific inbred line “Maxchata”. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, p. 24008-24028, 2013.

- BHOOMIKA, K.; PYNGROPE, S.; DUBEY, R. S. Differential responses of antioxidant enzymes to aluminum toxicity in two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars with marked presence and elevated activity of Fe SOD and enhanced activities of Mn SOD and Catalase in aluminum tolerant cultivar. **Plant Growth Regulation**, v. 71, p. 235-252, 2013.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CAMEJO, D.; JIMÉNEZ, A.; ALARCÓN, J. J.; TORRES, W.; GÓMEZ, J. M.; SEVILLA, F. Changes in photosynthetic parameters and antioxidant activities following heat-shock treatment in tomato plants. **Functional Plant Biology**, v. 33, p. 177-187, 2006.
- CHAITANYA, K.; SUNDAR, D.; MASILAMANI, S.; REDDY, A. R. Variation in heat stress-induced antioxidant enzyme activities among three mulberry cultivars. **Plant Growth Regulation**, v. 36, p. 175-180, 2002.
- DEL LONGO, O. T.; GONZÁLES, C. A.; PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. S. Antioxidant defenses under hyper oxygenic and hyper osmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, v. 34, p. 1023-1028, 1993.
- DU, H.; ZHOU, P.; HUANG, B. Antioxidant enzymatic activities and gene expression associated with heat tolerance in a cool-season perennial grass species. **Environmental Experience Botany**, v. 87, p. 159-166, 2013.
- GILLILAND, S. E. Enzymatic determination of residual hydrogen peroxide in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 52, n. 3, p. 321-324, 1969.
- HODGES, D. M.; FORNEY, C. F. The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 645-655, 2000.
- JUNK-KNIEVEL, D. C.; VANDENBERG, A.; BETT, K. E. Slow Darkening in Pinto Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seed Coats is Controlled by a Single Major Gene. **Crop Science**, Madison, v. 48, p. 189-193, 2008.
- KARABAL, E.; YÜCEL, M.; ÖKTEM, H. A. Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. **Plant Science**, Madison, v. 164, p. 925-933, 2003.
- LEE, D. H.; LEE, C. B. Chilling stress induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. **Plant Science**, Madison, v. 159, p. 75-85, 2000.
- LIU, X.; HUANG, B. Heat stress injury in relation to membrane lipid per oxidation in creeping bent grass. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 503-510, 2000.