

**MODIFICAÇÕES DE CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS
E DE ENZIMAS PÉCTICAS EM JABUTICABA [PLINIA
TRUNCIFLORA (BERG) KAUSEL – MYRTACEAE]**

HERBERT CAVALCANTE DE LIMA

2002



HERBERT CAVALCANTE DE LIMA

**MODIFICAÇÕES DE CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS E DE
ENXIMAS PÉCTICAS EM JABUTICABA [PLINIA
TRUNCIFLORA (BERG) KAUSEL – MYRTACEAE]**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
MG como parte das exigências do programa de
Ciências dos Alimentos, para obtenção do grau de
"Doutor".

Orientador
Prof. Dr. Adimilson Bosco Chitarra

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2002**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Lima, Herbert Cavalcante de

Modificação de carboidratos estruturais e de enzimas pécticas em jabuticaba
[*Plinia trunciflora* (Berg) Kausel – Myrtaceae] / Herbert Cavalcante de Lima. --
Lavras : UFLA, 2002.

p. : 68 il.

Orientador: Adimilson Bosco Chitarra.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Jabuticaba. 2. Bemisia cauliforme. 3. amadurecimento. 4. Parece celular. 5.
Beta-galactosidase. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.42

-664.80442

HERBERT CAVALCANTE DE LIMA

**MODIFICAÇÕES DE CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS E DE ENZIMAS
PÉCTICAS EM JABUTICABA [PLINIA TRUNCIFLORA (BERG) KAUSEL
– MYRTACEAE]**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
MG como parte das exigências do programa de
Ciências dos Alimentos, para obtenção do grau de
“Doutor”.

APROVADA em 04 de novembro de 2002

Prof. Dr. Eduardo Valério B. Vilas Boas	UFLA
Prof. Dr. José Donizeti Alves	UFLA
Prof. Dr. Marcelo Murad Magalhães	UFLA
Profª. Dra. Maria Isabel Chitarra	UFLA


Prof. Dr. Adimilson Bosco Chitarra
UFLA
(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL**

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL	i
GENERAL ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1	01
1 Introdução geral	01
2 Referencial teórico	03
2.1 A espécie e seu cultivo	03
2.2 Aspectos gerais sobre o fruto	05
2.3 Mudanças químico-estruturais na parede celular	08
2.4 Enzimas degradadoras de parede celular	12
3 Referências bibliográficas	15
CAPÍTULO 2: Modificações de carboidratos estruturais e atividade das enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase em jabuticaba [<i>Plinia trunciflora</i> (Berg) Kausel-MYRTACEAE].....	18
Resumo.....	18
Abstract	19
1 Introdução.....	20
2 Material e métodos	21
2.1 Firmeza do fruto	22
2.2 Pectinametilesterase.....	22
2.3 Poligalacturonase	23
2.4 Composição de açúcares neutros	23
2.5 Uronídeos totais	25
2.6 Açúcares neutros totais	26
2.7 Cálcio ligado à fração CDTA	26
2.8 Perfil do peso molecular de polímeros da fração CDTA	26
3 Resultados e discussão.....	27
3.1 Firmeza do fruto e atividade da PME e PG	27
3.2 Composição de açúcares neutros	28
3.3 Uronídeos e açúcares totais	32
3.4 Cálcio ligado à fração CDTA	37

3.5 Perfil do peso molecular de polímeros da fração CDTA	39
4 Conclusões.....	43
5 Referências bibliográficas	44
CAPÍTULO 3: Atividade das enzimas β-galactosidase em jabuticaba [<i>Plinia trunciflora</i> (Berg) Kausel-MYRTACEAE]	46
Resumo.....	46
Abstract	47
1 Introdução.....	48
2 Material e métodos	50
3 Resultados e discussão.....	53
4 Conclusões.....	60
5 Referências bibliográficas	61

RESUMO GERAL

LIMA, Herbert Cavalcante de. **Modificações de carboidratos estruturais e de enzimas pécnicas em jabuticaba [*Plinia trunciflora* (Berg) Kausel-MYRTACEAE]**. 2002. 61 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

A jabuticabeira é uma espécie nativa do Brasil, cujo fruto denominado jabuticaba, é muito apreciado para consumo ao natural e para elaboração de geléias, licores e doces. O fruto possui mercado ainda restrito à região de produção e um dos fatores que contribuem para isso é a rápida perda de firmeza pós-colheita. Pouco ainda se conhece sobre os fatores envolvidos no rápido amolecimento e curto período de vida pós-colheita do fruto. Na busca de tais conhecimentos foi executada a presente pesquisa, dividida em dois experimentos e que tiveram como objetivos: I - caracterizar as modificações de carboidratos de parede celular e associa-las à perda de firmeza e à atividade das enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase; II - determinar a atividade da enzima β -galactosidase do fruto, extrair, purificar e caracterizar a seqüência N-terminal da enzima do fruto maduro. Os frutos foram coletados em um pomar doméstico localizado na cidade de Lavras, MG e analisados em Laboratório da Universidade Federal de Lavras. No experimento I, as análises foram realizadas em frutos coletados aos 30, 35, 40, 45 e 50 dias após o florescimento da planta. A firmeza do fruto apresentou marcada redução no período estudado, estabilizando nos dois últimos estádios estudados. A composição das frações pécnicas extraídas em água fria, água quente e CDTA 50 mM mostraram predominância de galactose, arabinose e ramnose. Na fração hemicelulose extraída com KOH 4M predominaram glicose e xilose. Os dados indicaram que durante o desenvolvimento do fruto ocorre uma intensa redistribuição de açúcares. Sugere-se que a perda de galactose observada nas frações água fria e água quente é compensada por nova síntese de açúcares e, possivelmente, resulta na formação de polímeros menos ramificados e de peso molecular mais elevado, o que refletiu o deslocamento do perfil dos polissacarídeos para a região de alto peso molecular aos 50 dias. A baixa atividade da poligalacturonase na casca e sua ausência na polpa, quando o fruto encontra-se com 45 e 50 dias, é indicativo de que outras enzimas hidrolases atuam promovendo a despolimerização da fração pécnica da parede celular durante o amadurecimento. Os fruto do experimento II foram analisados em cinco estádios: I – colhidos 35 dias após a floração (fruto verde), II – colhidos 45 dias após a floração (fruto imaturo mudando de cor, “menos que 50% rajado”), III – colhidos 47 dias após a floração (fruto imaturo mudando de cor, “mais que 70% rajado”) e IV – colhidos 50 dias após a floração (fruto maduro, cor preta) e V – colhidos 50 dias após a

floração (fruto maduro, cor preta) e armazenados por 3 dias em temperatura ambiente ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$). A β -galactosidase apresentou elevada atividade no início do período estudado, decrescendo em seguida (até o estágio III) para então apresentar um pico que coincide com o estágio IV (maduro) e novo decréscimo até o estágio final estudado (fruto em senescência). O procedimento utilizado para a purificação da enzima resultou em um fator de purificação de 16 vezes. Os passos da purificação foram acompanhados por eletroforese em gel SDS-PAGE e confirmados por imunensaio de western blot. A eletroforese indicou a presença de duas bandas, na faixa de 60 e 90 kDa. Três isoformas da enzima foram isoladas por HPLC em fase reversa e determinada a seqüência N-terminal.

Orientador: Adimilson Bosco Chitarra

GENERAL ABSTRACT

LIMA, Herbert Cavalcante de. **Structural carbohydrates modifications and pectinases activity in jabuticaba fruit [*Plinia trunciflora* (Berg) Kausel-MYRTACEAE]**. 2002. 61 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Jabuticabeira is a native species of Brazil, whose fruit denominated jabuticaba is very appreciated for consumption to the natural and for elaboration of jellies, marmalades and liquors. The fruit possesses market still restricted to the production area and one of the factors that contribute to that is the fast loss of firmness of the fruit. Little it is known on the main changes that happen during her development cycle, mainly about the factors involved in the fast softening and short period of life powder-crop. In the search of such knowledge it was executed to present researches, divided in two experiment : I - to characterize the modifications of carbohydrates of cell wall and to associate to the loss of firmness and the activity of the enzymes pectinametilsterase and poligalacturonase; II - to Determine the activity of the enzyme β -galactosidase and to extract, to purify and to characterize the N-terminal sequence of that enzyme in the ripe fruit. The informations was collected at Lavras University, in Lavras, Minas Gerais, Brazil. In experiment I the analyses were accomplished to the 30, 35, 40, 45 and 50 days after blossom of the plant. The firmness of the fruit presented marked reduction in the studied period, stabilizing in the 45 and 50. The composition of the pectics fractions showed galactose, arabinose and ramnose predominance. In the fraction hemicelulose extracted with KOH 4M, glucose and xilose prevailed. The data indicated that during the development of the fruit happens an intense turnover of sugar. It suggests that the galactose loss observed in the fractions cold water and hot water, is compensated by new synthesis of sugar and possibly it results in the formation of polymeric less ramified and of higher molecular weight, what reflected the displacement of the profile of the polyssacarides for the area of high molecular weight to the 50 days. The low activity of the poligalacturonase in the peel and her absence in the pulp when the fruit is with 45 and 50 days is indicative that other hidrolases act promoting the despolimerização of the fraction péctica of the cell wall during the ripening. The fruit of the experiment II were analyzed at five stadiums: I - harvested 35 days after the blossom (green fruit), II - harvested 45 days after the blossom (immature fruit changing of color), III - harvested 47 days after the blossom (immature fruit changing of color) and IV - harvested 50 days after the blossom (ripe fruit, dark color) and V - harvested 50 days after the blossom (ripe

fruit, dark color) and stored 3 days in room temperature ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$). The enzyme β -galactosidase presented high activity in the beginning of the studied period, decreasing soon afterwards (until the stadium III) for then to present a pick that coincides with the stadium IV (ripe) and new decrease until the studied final stadium (senescence). The procedure used for the purification of the enzyme, it resulted a factor of purification of 16 times. The steps of the purification were accompanied by eletroforese in gel SDS-PAGE and confirmed by western blot. The eletroforese indicated the presence of two spots, in the strip of 60 and 90 kDa. Three isoformas of the enzyme were isolated for HPLC in reverse and certain phase to sequences N-terminal.

Adviser: Adimilson Bosco Chitarra

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

A jabuticaba, fruto da jabuticabeira [*Plinia trunciflora* (Berg) Kausel – MYRTACEAE], é produzida predominantemente em pequenos plantios e possui ainda pouca expressão comercial. Como muitas outras fruteiras nativas do Brasil, possui mercado restrito às regiões produtoras. O fruto é bastante apreciado, não só para o consumo ao natural, como também para o preparo de licores, doces e geléias. A cultivar mais apreciada é a Sabará, cujo fruto tem ciclo de desenvolvimento que varia de 45 a 65 dias, dependendo das condições climáticas.

Devido à grande aceitação do fruto, o estímulo à produção vem crescendo consideravelmente. Durante a safra, os frutos são comercializados em feiras livres e mercados municipais, geralmente expostos em condições precárias, armazenados em caixas de papelão, madeira ou latas, mantidos sob temperatura ambiente e comumente sem tratamento pós-colheita. Nessas condições, a maioria dos frutos perde o valor comercial no período de 2 a 3 dias.

Uma série de mudanças físicas, químico-estruturais e sensoriais acontece durante a vida dos frutos. O padrão de crescimento pode ser estudado pelas de observações das principais modificações físicas. Na formação de características relacionadas ao sabor, são importantes as alterações na composição de ácidos orgânicos, carboidratos e compostos voláteis. O amaciamento do fruto é atribuído à perda de firmeza dos tecidos e está associado à mudanças na composição da parede celular, em decorrência de alterações na estrutura e composição dos carboidratos estruturais, como pectinas, hemiceluloses e celulose. Diversas enzimas catalisam reações de degradação da parede celular de frutos.

O uso de tecnologias para conservação pós-colheita tem possibilitado o aumento na oferta de frutos. Para a definição da estratégia tecnológica que será indicada para prolongar a vida pós-colheita e preservar características de qualidade, é fundamental a geração de conhecimento básico para melhor entendimento sobre o padrão de desenvolvimento do fruto e compreensão das principais mudanças decorrentes do amadurecimento, que levam à senescência.

Em relação à jabuticaba, pouco se sabe sobre as principais mudanças que ocorrem durante o desenvolvimento do fruto, principalmente sobre os fatores envolvidos em sua rápida perda de firmeza. Na busca de tais conhecimentos, foi executada a presente pesquisa, cujos resultados são aqui apresentados e que tiveram como objetivos:

- caracterizar as modificações de carboidratos de parede celular em cinco diferentes estádios de desenvolvimento do fruto e associa-las à perda de firmeza e à atividade das enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase (Capítulo 2);
- determinar a atividade da β -galactosidase em cinco diferentes estádios de desenvolvimento do fruto (Capítulo 3);
- extrair, purificar e caracterizar a seqüência N-terminal da β -galactosidase do fruto maduro (Capítulo 3).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A espécie e seu cultivo

A jabuticabeira [*Plinia trunciflora* (Berg) Kausel – MYRTACEAE] é uma espécie nativa do Brasil. No ambiente natural, é uma planta perenifólia, mesófila ou heliófita e seletiva higrófila, encontrada na mata pluvial atlântica e nas submatas de altitude, dispersa na faixa que vai do sul do Rio Grande do Sul ao estado da Bahia, chegando, a oeste, até os estados de Goiás e Mato Grosso. Raramente é encontrada no interior da floresta sombria (Lorenzi, 2000).

Atualmente, é encontrada nas demais regiões do Brasil e em países vizinhos, como Bolívia, Paraguai, norte da Argentina, Uruguai e Peru. Há registros de que foi introduzida nos Estados Unidos, estado da Califórnia em 1904, onde vem sendo cultivada nas regiões de Santa Barbara, San Diego, Spring Valley, Bostonia, Encinitas, sul de Los Angeles e ao norte de São José e São Francisco. Há também registro de cultivo na Flórida e no Havai.

Quando adulta a planta apresenta altura que varia de 10 a 15 metros e tronco liso de 30 a 40 cm de diâmetro. Possui folhas simples de 6 a 7 cm de comprimento por 2 a 3 cm de largura. Flores e frutos são fixados no caule. Produz grande quantidade de frutos, duas ou mais vezes ao ano, o que garante sua regeneração natural nas regiões de origem. Floresce geralmente nos meses julho-agosto e novembro-dezembro (Lorenzi, 2000).

Os dados mais recentes, referentes ao Censo Agrícola do ano de 1996, demonstram que o cultivo da jabuticabeira é mais expressivo na faixa compreendida por sua dispersão natural, que vai do sul do Rio Grande do Sul até Minas Gerais. A produção nacional perfaz um montante de 1.0467,31 toneladas de frutos, sendo que as regiões sudeste e sul concentram cerca de 85% da produção. O estado de maior produção do fruto é Minas Gerais, seguido pelo

Paraná e Rio Grande do Sul. Juntos, esses estados somam mais de 65% da produção nacional (FIBGE, 2002), conforme apresentado nas Tabelas 1 e 2.

TABELA 1: Distribuição da produção nacional de jabuticaba no ano de 1996 (toneladas/ha).

Condição do produtor	Brasil	Norte	Nordeste	Sudeste	Sul	Centro-Oeste
Proprietário	9.739,66	36,15	615,71	5.175,47	3.108,92	803,41
Arrendatário	290,63	-	4,81	194,95	62,37	28,49
Parceiro	135,72	-	7,71	60,05	67,26	0,7
Ocupante	301,30	0,57	70,04	109,47	99,32	21,9
Total	1.0467,31	36,72	698,27	5539,94	3.337,87	854,5
%	100	0,35	6,67	52,93	31,89	8,16

Fonte: IBGE - Censo Agrícola/1996

TABELA 2: Maiores produtores de jabuticaba no ano de 1996 (toneladas/ha).

Estado	Toneladas	%
Minas Gerais	4035,16	38,55
Paraná	1743,19	16,65
Rio Grande do Sul	1120,41	10,70
São Paulo	1036,89	9,91
Goiás	708,30	6,77
Santa Catarina	474,08	4,53
Paraná	382,55	3,65
Espírito Santo	239,47	2,29
Rio de Janeiro	228,34	2,18
Pernambuco	122,15	1,17
Demais	376,77	3,60

Fonte: IBGE - Censo Agrícola/1996

A cultivar conhecida como Sabará é a mais apreciada do gênero Plínia. Caracteriza-se por ser uma planta perene de grande rusticidade e muito produtiva, chegando a frutificar duas ou mais vezes ao ano, durante 30 a 50 anos

(Gomes, 1986). O fruto é uma baga globosa, com 20 a 30 mm de diâmetro, com polpa macia, esbranquiçada e succulenta, de sabor pouco ácido e adocicado. Apresenta ciclo de desenvolvimento de cerca de dois meses, sendo que na estação fria do ano, na cidade de Viçosa, MG, ocorre em 65 dias (Magalhães, 1996a).

Na cidade de Lavras, MG, as plantas geralmente florescem duas vezes ao ano, nos meses de julho-agosto e outubro-novembro. O desenvolvimento do fruto dá-se no período de 50 a 55 dias. A longevidade produtiva é uma característica marcante da espécie. Entre moradores da cidade de Lavras, é comum a indicação de plantas com mais de 100 anos e ainda em franca produção (Dr. Maurício de Souza - Professor aposentado da UFPA - Comunicação pessoal).

2.2 Aspectos gerais sobre o fruto

Frutos são órgãos originados do crescimento das estruturas que formam as flores ou inflorescências. As diferentes fases de desenvolvimento dos frutos são caracterizadas por alterações na estrutura, fisiologia e bioquímica das células que, ao final, culminam com a morte dos tecidos (Finger & Vieira, 2002).

O ciclo de vida dos frutos pode ser didaticamente dividido em três fases: crescimento, maturação e senescência. Uma distinção exata entre as fases é difícil de ser determinada precisamente. Conceitualmente, crescimento envolve divisão e subsequente expansão das células. A maturação é marcada pelas mudanças mais importantes na vida do fruto e inicia-se antes do final do crescimento. O período de desenvolvimento inclui as fases de crescimento e maturação. A senescência compreende o período final da vida do fruto e pode ser definida como a fase em que os processos bioquímicos anabólicos de síntese dão lugar aos processos catabólicos de degradação. O termo amadurecimento é utilizado para designar o período em que o fruto encontra-se entre o final da

maturação e o início da senescência. Esta fase caracteriza-se por mudanças relacionadas ao amaciamento da polpa, alterações da coloração da casca e polpa, redução da adstringência, desenvolvimento do aroma e sabor característicos, entre outras (Wills et al., 1982; Chitarra & Chitarra, 1990; Finger & Vieira, 2002).

Uma combinação de crescimento e diferenciação dos tecidos caracteriza o intervalo de tempo que vai da antese até o final do desenvolvimento e varia em função da espécie, variedade e fatores climáticos. Esse intervalo pode levar cerca de três semanas para algumas variedades de morango e até 60 semanas no caso de laranjas. Há aumento de volume em cerca de 40 vezes durante o desenvolvimento da abóbora e de até 300.000 vezes em abacate (Coombe, 1976).

Magalhães et al. (1996b) verificaram que frutos de jabuticabeiras cultivada nas condições de Viçosa, MG apresentaram ciclo de 65 dias. O desenvolvimento do fruto foi estudado a partir de características de crescimento, por meio do monitoramento do acúmulo de matéria seca, matéria fresca e incrementos no volume. O fruto apresentou crescimento do tipo sigmoidal e ajustou-se ao modelo logístico de Richards (1969).

Segundo Magalhães et al. (1996b), a primeira fase de desenvolvimento da jabuticaba é caracterizada por um baixo acréscimo nas características de crescimento. A mudança da primeira para a segunda fase ocorre por volta de 25 dias após a antese para comprimento do fruto, 27 dias em relação ao diâmetro, 37 dias para o volume, 28 dias em relação à matéria seca e 35 dias para o peso fresco do fruto. Um grande acúmulo de matéria fresca e seca e acréscimos no volume caracterizaram a segunda fase ou fase de crescimento rápido. Nessa fase, a expansão do fruto é marcante, devido ao rápido crescimento no volume, comprimento e diâmetro. Ocorre também elevada absorção de água nesse estágio, resultando em elevação no teor de matéria fresca, semelhante ao

verificado em frutos de maracujeiro por Pocasandre-Enamorado et al. (1995). Estes autores observaram que o fruto interrompe o crescimento em volume aos 54 dias, enquanto o teor de matéria seca eleva-se até o final do desenvolvimento, cerca de 57 dias após a antese. Nesse período ocorre um acentuado acúmulo de matéria seca na polpa e sementes e redução na espessura da casca decorrente na redução do teor de matéria seca na mesma.

Na terceira fase do desenvolvimento da jabuticaba ocorreu estabilização nas variáveis de crescimento estudadas. Os dados coletados por Magalhães et al. (1996b) indicaram que a transição da 2ª para a 3ª fase dá-se por volta de 57 dias em relação ao teor de matéria fresca, 54 a 56 dias para comprimento e volume, e 50 a 52 dias para o volume do fruto.

A concentração de clorofila na casca declinou por volta de 50 a 60 dias após a antese, ao final da fase de expansão do fruto, precedendo o início dos incrementos de antocianinas. Os autores relacionaram o acúmulo acentuado de antocianina com o amadurecimento do fruto, conforme ocorre com uva (Magalhães et al., 1996b).

Barros et al. (1996) estudaram mudanças em carboidratos não estruturais na jabuticaba e verificaram que uma substancial elevação no teor de açúcares totais e redutores coincide com o aumento do volume do fruto. Cerca de 50 dias após o florescimento, o fruto apresenta máximo tamanho. Entretanto, o teor em matéria seca e açúcares solúveis continua a acumular na casca e polpa até o final do amadurecimento, por volta de 57 dias. A partir desse estágio ocorrem decréscimos em açúcares totais e redutores até o final do desenvolvimento, indicando o estágio de passagem à senescência. Os autores citam que tal padrão de mudanças de açúcares também foi verificado em uva, maçã e manga. O teor de amido no fruto elevou-se até 45 dias após o florescimento e segundo os autores, deveu-se à acumulação desse polímero no endocarpo. Em seguida o teor

de amido no fruto apresentou decréscimo, que foi atribuído à hidrólise intensa de amido da polpa e casca.

2.3 Mudanças químico-estruturais na parede celular

A parede celular (PC) dos frutos carnosos é um material complexo, que compreende uma estrutura formada por microfibrilas de celulose, envolvidas por uma matriz de polímeros de pectina, hemicelulose, ligninas e proteínas, além de outros componentes em menor quantidade, como substâncias incrustantes, ceras, cutina e minerais (Carpita & Gibeaut, 1993).

O conhecimento da estrutura da PC é importante para a tecnologia pós-colheita e também necessário para a definição de procedimentos para beneficiamento industrial. A estratégia utilizada para promover amadurecimento uniforme ou então retardar a senescência de um fruto depende do conhecimento das reações bioquímicas que ocorrem nesses componentes da célula. Na fabricação de sucos, néctares, geléias e vinhos, o conhecimento da constituição da parede celular da matéria-prima é fundamental para definir etapas na indústria. Atualmente, na indústria de sucos, a degradação enzimática de parede celular é muito utilizada para a obtenção de produtos de melhor qualidade.

A estrutura da PC tem sido muito estudada e vários modelos são propostos para a sua organização. Entre os vários modelos, Bruce et al. (1997) citam que prevalece a idéia que a PC de células vegetais é constituída de três camadas: lamela média, parede primária e parede secundária.

A lamela média é formada durante a divisão celular. Possui função de manter as células vizinhas unidas e é composta principalmente por pectina. Ao final da divisão celular, o aumento do volume do protoplasto e de organelas, como também a inclusão de água pelos vacúolos, provoca a ampliação da extensão celular. Nesta fase, a parede celular primária é formada e acomoda o conteúdo celular. Possui constituição fina, é apenas semi-rígida e constituída de

pectina, hemicelulose e celulose, além de proteínas e compostos fenólicos. É na parede primária que ocorrem as principais mudanças na estrutura e composição dos polímeros durante o amadurecimento de frutos (Rodionova & Bezborodov, 1997; Carpita & Gibeaut, 1993).

Ao final da fase de o crescimento celular, a parede primária não mais necessita se expandir ou, então, a parede é simplesmente retida. Ou ainda, muito mais comumente, uma parede celular secundária rígida é produzida, tanto pelo espessamento da parede primária ou pela deposição de novas camadas com uma composição diferente da parede primária (Rodionova & Bezborodov, 1997; Carpita & Gibeaut, 1993).

Além de seu papel estrutural, a parede celular também protege a célula subjacente e atua no transporte de fluidos dentro da planta. Quando as células vegetais tornam-se especializadas, elas geralmente produzem tipos de parede adaptada. Por isso possuem composição diferenciada, de acordo com as quais se pode reconhecer e classificar os diferentes tipos celulares da planta (Goodwin & Mercer, 1990; Brett & Waldron, 1990).

Os modelos mais aceitos de organização da parede celular de vegetais superiores em geral são representados por uma estrutura composta de uma forte rede entrelaçada de microfibrilas de celulose cristalina embebida com lignina, sustentando uma matriz amorfa que flutua em gel aquoso composto de diferentes frações de hemicelulose e substâncias pécnicas. Estas ligam-se a proteínas que, por sua vez, ligam-se à matriz de xiloglucanas e celulose. As xiloglucanas constituem as principais moléculas responsáveis pela interligação das microfibrilas de celulose com os polissacarídeos da matriz, dando sustentação à rede. Outros polissacarídeos não-celulósicos, como as glucomananas, galactoglucomananas, galactomananas, (1,3) beta-D-glucanas e glucuronoarabinoxilanas, são consideradas como interligantes, mas em muito menor quantidade. Por outro lado, também há registros de outros

polissacarídeos, como as arabinanas, galactanas e arabinogalactanas altamente ramificadas, de várias configurações e tamanhos que apresentam-se ligados ao esqueleto de substâncias pécticas, formando ramificações (Carpita & Gibeault, 1993; Lamport & Epstein, 1983).

O amadurecimento dos frutos carnosos leva ao amaciamento dos tecidos do mesocarpo, que geralmente é a parte comestível. O estudo desse fenômeno pode ser feito por meio do monitoramento das alterações que ocorrem na parede celular. Por meio de análises laboratoriais é possível determinar os níveis de despolimerização de carboidratos estruturais, a conversão da protopectina insolúvel à pectina solúvel, as modificações no grau de esterificação da pectina, o teor de cálcio ligado à parede celular, a composição de açúcares totais e ácidos urônicos, entre outros. Os eventos de amadurecimento são o prenúncio da senescência e resultam na desestruturação e enfraquecimento da parede celular, alterações na integridade das membranas, rompimento e morte das células.

Magalhães et al. (1996a) estudaram as mudanças estruturais que ocorrem nos principais polímeros de parede celular da jaboticaba. Nas condições em que o experimento foi realizado, os frutos, aos 65 dias após o florescimento, já se encontravam em franca senescência. Verificaram que a celulose foi o carboidrato estrutural predominante, seguido de hemicelulose e pectina. A elevação da concentração desses polímeros ocorreu na fase de crescimento ativo dos frutos, coincidindo como o rápido crescimento do volume e matéria seca após o 40º dia da floração da planta.

A concentração de celulose nos frutos eleva-se até o final do desenvolvimento. Após o 53º dia, a acumulação de hemicelulose apresentou-se relativamente estável, enquanto o teor em pectina reduziu após o 55º dia. Barros et al. (1996) citam que o fruto muda de cor e amadurece com cerca de 55 dias após a floração. Os autores sugeriram que o decréscimo nas substâncias pécticas foi devido, possivelmente, à solubilização desses componentes, o que também



foi verificado no decorrer do desenvolvimento de tomate e pêra (Dalal et al., 1965; Yamaki et al., 1979). Recentes estudos sobre o metabolismo de parede celular têm demonstrado que ocorre em diversos frutos um processo ordenado, envolvendo primeiramente relaxamento da parede celular e degradação de hemicelulose, seguido de despolimerização da fração péctica nos estádios finais de amadurecimento (Huber et al., 2001).

A hemicelulose na jabuticaba declinou durante a fase de expansão rápida. Percebe-se uma semelhança entre o acúmulo de matéria seca do fruto (Barros et al., 1996) e a redução no teor de hemicelulose (Magalhães et al., 1996a). Os autores sugerem que isso ocorre devido à utilização desses carboidratos estruturais para a formação de PC durante a fase de crescimento rápido do fruto. A queda nos níveis relativos de hemiceluloses verificados na polpa do fruto fortalece essa hipótese (Magalhães et al., 1996b).

Durante o processo normal de desenvolvimento de frutos, o cálcio tem sido associado à manutenção e proteção da integridade da PC. Em alguns casos, a perda de material péctico na fase inicial de desenvolvimento dos frutos é, em seguida, compensada por nova síntese de cadeias de ácido galacturônico. O material que é incorporado “*de novo*” à parede celular apresenta-se altamente metilado. Em decorrência disso, sua desesterificação e ligação com o cálcio necessitam da ação da enzima pectinametilsterase. Após a desesterificação das pectinas, o cálcio pode ser novamente incorporado à parede, formando a estrutura denominada “egg box”, que impede a despolimerização da pectina pela ação da enzima poligalacturonase (Moustacas et al., 1991).

Os principais monômeros de carboidratos estruturais que compõem a parede celular da jabuticaba ainda não foram quimicamente caracterizados. A literatura indica uma série de metodologias de fracionamento de material de parede celular entre os principais polímeros, ou seja, a extração da fração péctica, hemicelulósica e celulósica. A partir do material fracionado, é possível,

então, determinar variações na composição em açúcares totais e uronídeos em cada fração. A cromatografia gasosa é o recurso mais utilizado atualmente para identificar monômeros de açúcares neutros que estruturam a PC.

2.4 Enzimas degradadoras de parede celular

Muitas proteínas de PC têm função enzimática e algumas delas são degradadoras de pectinas e hemiceluloses. Pectinametilesterase, poligalacturonase, α - e β -galactosidase, β -glicosidase, α - e β -xilosidase e α -arabino-furanosidase, α - e β -manosidase, xiloglucana-endotransglicosilase são alguns exemplos de enzimas degradadoras de parede celular (Tateishi et al., 1996; Brett & Waldron, 1990; Brummell & Harpeter, 2001).

A desestruturação da fração péctica da PC, durante o amadurecimento de frutos, tem sido apontada como resultante da ação de enzimas pectinolíticas, entre elas a pectinametilesterase (EC 3.2.2.22), poligalacturonase (exo EC 3.2.1.67; endo EC 3.2.1.15) e β -galactosidase (3.2.1.23). Estudos têm mostrado que essas enzimas não são as causadoras primárias do amolecimento, no entanto, parece evidente que atuam favorecendo mudanças na firmeza de frutos (Huber et al., 2001; Fischer & Bennett., 1991).

A pectinametilesterase atua no substrato péctico removendo grupos metoxil de ácido galacturônico metilado, o que resulta na formação de metanol e cadeias de baixo grau de metoxilação. Essa enzima não reduz a viscosidade de soluções, pois não provoca despolimerização da cadeia péctica. Na presença de ions cálcio, a viscosidade pode até elevar-se, pois o cálcio forma ligações cruzadas com os grupos carboxílicos livres de cadeias alongadas e desesterificadas de ácido galacturônico, formando o modelo “egg box” e impedindo a despolimerização pela poligalacturonase (Brett & Waldron, 1990).

A poligalacturonase pode atuar ao acaso dentro da cadeia péctica (endo), ou nas extremidades não redutoras (exo). Ambas promovem a despolimerização

de polímeros de ácido galacturônico, havendo fortes evidências de que atuam melhor em cadeias com baixo grau de grupos metilesterificados. A exo-PG lisa a cadeia em pequenos fragmentos, entretanto, isto não provoca redução de viscosidade. A endo-PG induz a despolimerização ao lisar a cadeia em pequenos fragmentos, produzindo uronídeos de menor peso molecular e, então, promovendo a redução da viscosidade. A atividade dessas enzimas pode ser estimada *in vitro*, pela medição da elevação dos grupos redutores após incubação da enzima com substrato de ácido poligalacturônico desesterificado.

Há evidências de que, em plantas superiores, a β -galactosidase é a única enzima que promove a clivagem direta de ligações β -(1-4) de galactanas, produzindo resíduos galactosil durante o amadurecimento de frutos (Smith et al., 1998). Sua atuação tem sido verificada nas extremidades não redutoras, por isso, é considerada uma exo-galactanase. De acordo com Carrington & Pressey (1996), a perda de galactose em tomates antisense para poligalacturonase sugere que a ação da β -galactosidase não necessita de uma atuação prévia daquela enzima para a redução do polímero ou solubilização do substrato péctico. Nos frutos estudados, verificou-se que a β -galactosidase estaria atuando desde a fase inicial de amadurecimento do fruto, desramificando galactanas e arabinogalactanas de cadeias laterais que ligam os esqueletos de ramnogalacturonanos a microfibrilas de celulose.

Alguns pesquisadores têm sugerido que a despolimerização da cadeia péctica da parede celular não é condição necessária à perda de firmeza de frutos. Pesquisas indicam que a solubilização de polímeros pécticos durante o amadurecimento de pêras e nectarinas não ocorre concomitante a níveis significativos de despolimerização (Tateishi et al., 1996; Dawson et al., 1992).

Diversas isoformas de β -galactosidase já foram associadas ao amadurecimento. Vários estudos com tomate, maçã, pêra, melão, abacate, kiwi, manga e mamão apresentam técnicas eficientes de extração e purificação de

isoformas de β -galactosidases associadas ao amadurecimento. As características bioquímicas da enzima nesses frutos têm sido bastante exploradas. Verifica-se em geral, que apresentam certa variação em relação ao peso molecular e afinidade pelo substrato (D'innocenzo, 2000; Tateishi et al., 2001).

Até então, nenhum estudo foi realizado em relação à caracterização da atividade de enzimas associadas à PC em frutos de jabuticabeira. Pesquisas nesta linha poderão contribuir para maior compreensão da rápida perda de firmeza e facilitar a adoção de tecnologias visando aumentar a vida pós-colheita do fruto.

3 Referências Bibliográficas

- BARROS, R.S.; FINGER, F.L.; MAGALHÃES, M.M. Changes in non-structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. *Scientia Horticulturae*, Oxford, v.66, p.209-215, 1996.
- BRETT,C.;WALDRON,K. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. London: Unwin Hyman, 1990.188 p.
- BRUCE, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 3ªed. Porto Alegre : Artes Médicas, 1997.p. 1001-1002.
- BRUMMELL, D.A.; HARPETER, M.H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v.47, p.311-340, 2001.
- CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, Oxford, v.3, p.1-30, 1993.
- CARRINGTON, C.M.S.; PRESSEY, R. β -galactosidase II activity in relation to changes in cell wall galactosyl composition during tomato ripening. **Journal American Society Horticulturae Science**, Geneva, v.21, p.132-136, 1996.
- CHITARRA, M.I.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL-FAEPE, 1990. 293p.
- COOMBE, B.G. The development of fleshy fruits. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.22, p. 507-52, 1976.
- DALAL, K.B. et al. Certain physiological and biochemical changes in developing tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Journal Food Science**, Chicago, v.30, p.504-508, 1965.
- DAWSON, D.M.; MELTON, L.D.; WATKINS, C.B. Cell wall changes in nectarines (*Prunus persica*). Solubilization and depolymerization of pectic and neutral polymers during ripening and in mealy fruit. **Plant Physiology**. Rockville, v.100, p.1203-1210, 1992.

D'INNOCENZO, M. **Evolução da atividade e expressão de enzimas e modificação da parede celular de mamões durante o amadurecimento.** 2000. 119p. Tese (Doutorado)-Universidade de São Paulo, São Paulo.

FINGER, L.V. ; VIEIRA, G. **Fisiologia pós-colheita de frutos tropicais e subtropicais.** In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo integrado: fruteiras tropicais – doenças e pragas.** Viçosa : UFV, 2002. p.2.

FISCHER, R.L.; BENNETT, A.B. **Role of cell wall hydrolases in fruit ripening.** **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.42, p. 675-703, 1991.

GOMES, R.P. **Fruticultura brasileira.** São Paulo: Nobel, 1986. 446p.

GOODWIN, T.W; MERCER,E.I. **Introduction to plant biochemistry.** 2.ed. Oxford: Pergamon, 1990. Cap. 4, p. 55-91.

HUBER, D.J.; KARAKURT, Y.; JEONG, J. **Pectin degradation in ripening and wounded fruits.** **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Paulo, v.13, n. 2, p.224-241, 2001.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA
Disponível em : <www.sidra.ibge.gov.br/agric/default.asp>. Acesso em: 5 ago. de 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agrícola.** Brasília, 1996.

LAMPORT,D.T.A.; EPSTEIN,L. **A new model for primary Cell Wall: a concatenated extensin-cellulose network.** **Curr.Top.Plant.Physio.** v.2, p.72-83, 1983.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas nativas do Brasil.** 3.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. v.1, p. 528.

MAGALHÃES, M.M.; BARROS, R.S.; FINGER, F.L. **Changes in structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jabuticaba*.** **Scientia Horticulturae**, Oxford, v.66, p.17-22, 1996a.

MAGALHÃES, M.M.; BARROS, R.S.; LOPES, N.F. **Growth relations and pigment in developing fruit of *Myrciaria jabuticaba*.** **Journal Horticultural Science**, Ashford, v.71, n. 6, p.925-930, 1996b.

MOUSTACAS, A. et al. Pectin methylesterase, metal ions in plant cell-wall extension. **Biochemistry Journal**, London, v.270, p.351-354, 1991.

POCASANDRE-ENAMORADO, H.E. et al. Development and ripening of yellow passion fruit. **Journal of Horticultural Science**, London, n.70, p. 573-576, 1995.

REDGWEEL, R.J. et al. Structures of the pectic polysaccharides from the cell walls of kiwifruit. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.226, p.287-302, 1992.

RICHARDS, F.J. The quantitative analysis of growth. In: STEWARD, F.C. (Ed.). **Plant physiology, a treatise**. New York: Academic, 1969. v.5, p. 3-76.

RODIONOVA, N.A.; BEZBORODOV, A.M. Localization of enzyme systems that degrade cell wall polysaccharides in higher plants: pectinases (review). **Applied Biochemistry Microbiology**. v.33, p.415-432, 1997.

SMITH, D.I.; STARRETT, D.A.; GROSS, K.C. A gene coding tomato fruit β -galactosidase II is expressed during fruit ripening. **Plant Physiology**, Rockville, v.117, p. 417-423, 1998.

TATEISHI, A.; INOUE, J.; SHIBA, H.; YAMAKI, S. Molecular cloning of β -galactosidase from japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) and its gene expression with fruit ripening. **Plant Cell Physiology**, v.42, n. 5, p.492-498, 2001.

TATEISHI, A.; KANAYAMA, Y.; YAMAKI, S. α -L-Arabinofuranosidase from cell walls of Japanese pear fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v.42, p.295-299, 1996.

YAMAKI, S.; MACHIDA, Y.; KAKIUCHI, N. Changes in cell wall polysaccharides and monosaccharides during development and ripening of Japanese pear fruit. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v.20, p.311-321, 1979.

WILLS, R.B.H. et al. **Postharvest. An Introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables**. 2.ed. Australia: New South Wales University. 1982. 167p.

CAPÍTULO 2

RESUMO

LIMA, Herbert Cavalcante de. Modificações em carboidratos estruturais e atividade das enzimas Pectinametilesterase e Poligalacturonase em jabuticaba [*Plinia trunciflora* (Berg) Kausel-MYRTACEAE]. In: _____. **Modificações de carboidratos estruturais e de enzimas pécnicas em jabuticaba [*Plinia trunciflora* (Berg) Kausel – MYRTACEAE]**. 2002. p.18-45. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

O objetivo do presente trabalho foi estudar modificações, caracterizar a composição de carboidratos estruturais e relacioná-las à perda de firmeza e atividade da PME e PG em da jabuticaba. Os frutos foram colhidos em pomar doméstico localizado em Lavras, MG, Brasil, na safra de novembro de 2000 e analisados no laboratório de bioquímica de frutos da Universidade Federal de Lavras. As determinações foram realizadas na casca (exocarpo) e polpa (mesocarpo) de frutos colhidos em cinco estádios de desenvolvimento: 30, 35, 40, 45 e 50 dias após o florescimento da planta. A firmeza do fruto apresentou redução significativa no período estudado, estabilizando ao final do desenvolvimento, nos estádios em que muda de coloração (45 dias) e amadurece (50 dias). A composição das frações pécnicas extraídas em água fria, água quente e CDTA 50 mM mostrou predominância de galactose, arabinose e ramnose. Na fração hemicelulose extraída com KOH 4M predominaram glicose e xilose. Os dados indicaram que, durante o desenvolvimento do fruto, ocorre uma intensa redistribuição de açúcares. Sugere-se que a perda de galactose observada nas frações água fria e água quente é compensada por nova síntese de açúcares e possivelmente, resulta na formação de polímeros menos ramificados e de peso molecular mais elevado, o que refletiu o deslocamento do perfil dos polissacarídeos para a região de alto peso molecular aos 50 dias. A baixa atividade da poligalacturonase na casca e sua ausência na polpa quando o fruto encontra-se com 45 e 50 dias é indicativa de que outras enzimas hidrolases atuam promovendo a despolimerização da fração pécnica da parede celular durante o amadurecimento.

Orientador: Adimilson Bosco Chitarra – UFLA

ABSTRACT

LIMA, Herbert Cavalcante de. Modifications of structural carboidratos, pectinametilesterase and poligalacturonase in jabuticaba [*Plinia trunciflora* (Berg) Kausel-MYRTACEAE]. In: _____. **Modificações de carboidratos estruturais e de enzimas pécticas em jabuticaba [*Plinia trunciflora* (Berg) Kausel – MYRTACEAE]**. 2002. p.18-45. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

The objective of the present work was to study modificações and to characterize the composition of structural carboidratos and to compare to the loss of firmness and activity of PME and PG in jabuticaba fruit. The fruits had been harvested in located domestic orchard in Lavras, MG, Brazil, in november of 2000. The analyses had been carried through in skin (exocarp), and pulp (mesocarp) of fruits harvested in 5 stadiums of development: 30, 35, 40, 45 and 50 days after the blossom, in the laboratory of biochemist of fruits of the Lavras Federal University. The firmness of the fruit presented significant reduction in the studied period, stabilizing to the end of the development, in stadiums where dumb of coloration (45 days) e ripens (50 days). The composition of the extracted pécticas fractions in cold water, hot water and CDTA 50mM had shown predominance of galactose, arabinose and ramnose. In the fraction hemicelulose extracted with KOH 4M had predominated glucose and xilose. The data had indicated that during the development of the fruit an intense redistribution of sugars occurs. The loss of galactose observed in the fractions is suggested that cold water and hot water, is compensated by *de novo* synthesis of sugars and possibly it results in the formation of ramified polymers less and raised molecular weight more, what it reflected the displacement of the profile of the polissacharides for the region of high molecular weight to the 50 days. Low the activity of poligalacturonase in the skin (exocarp) and its absence in the pulp (mesocarp) when the fruit meets with 45 and 50 days is indicative that other enzymes hidrolases act promoting the despolimerização of the péctica fraction of the cellular wall during the ripening.

Adviser: Adimilson Bosco Chitarra

1 INTRODUÇÃO

A jabuticaba, fruto da jabuticabeira [*Plinia trunciflora* (Berg) Kausel-MYRTACEAE], é produzida predominantemente em pequenos plantios e possui ainda pouca expressão comercial. Como muitas outras fruteiras nativas do Brasil, possui mercado ainda restrito às regiões produtoras. O fruto é muito apreciado para consumo ao natural, como também bastante utilizado na fabricação de doces, geléias e licores. O curto período de vida pós-colheita do fruto tem sido apontado como um dos fatores que dificultam a ampliação do consumo além das regiões. Nas condições em que é comercializado, geralmente transportado e acondicionado indevidamente, ocorre intensa perda de firmeza do fruto, o que leva a perdas em características importantes, tanto para o consumo ao natural como para o processamento.

A perda de firmeza dos frutos, decorrente de processos fisiológicos, tem sido atribuída à ação de enzimas hidrolases de carboidratos estruturais, principalmente aquelas que atuam sobre substâncias pécticas e hemiceluloses. A pectinametilesterase (PME) e a poligalacturonase (PG) atuam, respectivamente, desesterificando e despolimerizando a fração péctica, favorecendo a desestruturação da matriz de parede celular.

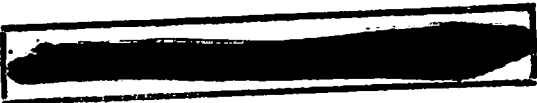
Algumas mudanças durante o desenvolvimento da jabuticaba foram estudadas (Barros et al., 1996; Magalhães et al., 1996 a;b). Entretanto ainda não há informação científica sobre a atividade e importância de hidrolases de pectinas no amadurecimento da jabuticaba.

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar as mudanças de firmeza, carboidratos estruturais e na atividade da PME e da PG em cinco diferentes estádios de desenvolvimento do fruto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

No experimento foram utilizados frutos de jabuticabeira [*Plinia trunciflora* (Berg) Kausel - MYRTACEAE], colhidos em pomar doméstico localizado em Lavras, MG no período setembro/outubro de 2000. Os dados meteorológicos referentes ao período do florescimento da planta até a colheita de frutos maduros foram coletados pelo Setor de Meteorologia da Universidade Federal de Lavras. No mês de setembro, a temperatura máxima registrada foi 25,5°C, a média 19,1°C e a mínima 15,0°C; a precipitação pluviométrica total no mês foi 109,0 mm; a umidade relativa média 72,0% e a taxa média de insolação 5,6 horas/dia. Em outubro a temperatura máxima chegou a 30,4°C, a média 23,0°C e a mínima 17,2°C; a precipitação pluviométrica total foi igual a 25,2 mm; a umidade relativa média 61,0 % e a taxa média de insolação 7,7 horas/dia. De acordo com a classificação de Koppen, a cidade de Lavras, MG possui clima do tipo Cwa e está localizada a 45° W GRW de longitude, a 21° 14' sul de latitude e encontra-se a 918,87 metros de altitude.

Para o estudo, os frutos foram coletados de uma planta de cerca de 60 anos, proveniente de semente. No dia de florescimento da planta (01/09/2000), foram selecionados e identificados os ramos para coleta de frutos, entre aqueles situados na região mediana central da copa. A análise dos frutos foi realizada no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA, na casca (exocarpo) e polpa (mesocarpo) de frutos colhidos aos 30 (fruto verde), 35 (fruto verde), 40 (fruto verde), 45 (fruto mudando de cor, "verde rajado") e 50 (fruto maduro, cor preta) dias após o florescimento da planta. Na última colheita, os frutos encontravam-se com 50 dias após o florescimento, que ocorreu no dia 20/10/2000. Em cada estágio coletou-se uma amostra composta de cerca de 2 kg de frutos. Ainda em campo, os frutos foram imediatamente resfriados, acondicionados sob refrigeração (15±3°C) e conduzidos ao



laboratório, onde fez-se uma seleção com base na uniformidade de tamanho, coloração e ausência de pragas. Os frutos selecionados foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -68°C para posterior realização das análises. Todo o procedimento para extração e determinação da atividade das enzimas foi conduzido a 4°C .

Os dados foram analisados seguindo modelo experimental em delineamento inteiramente casualizado. Na análise estatística, utilizou-se o software SISVAR DEX-UFLA versão 4.3. A regressão entre estágio de desenvolvimento e as características avaliadas foi realizada por meio do programa Sigma Plot 2.0 For Windows, tomando-se como critérios o valor de r^2 ajustado, a significância estatística-F do r^2 e a significância das características da equação pelo teste T. Foram estudadas as variáveis descritas a seguir:

2.1 Firmeza do fruto

Determinada com auxílio de aparelho analisador de textura TX-XT2 (Texture Analyser, SMS, England), com sonda 23 mm de diâmetro, ajustado para as seguintes condições de trabalho: velocidade pré-teste 2,0mm/s; velocidade do teste 10mm/s; velocidade pós-teste 2,0mm/s; distância de penetração 3 mm; força usada 0,5kg. Para cada estágio foram feitas leituras em 20 frutos.

2.2 Pectinametilesterase (PME)

Para extração da enzima foram pesadas cerca de 50 gramas de amostra em triplicata. Amostras de casca e polpa correspondentes a cada estágio foram trituradas em politron com 50 mL NaCl 0,2N. Os respectivos extratos foram levados à centrífuga a 2500xg por 10 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados para determinação da atividade enzimática. O doseamento da PME seguiu técnica descrita por Jen & Robinson (1984). Fez-se a incubação do

extrato bruto não dialisado com solução de pectina cítrica (1% em NaCl 0,2 N, pH 7,0), à temperatura ambiente e acompanhou-se a desmetilação da pectina, por 10 minutos, mantendo-se o pH 7,0 por meio da titulação do incubado com solução de NaOH 0,01 N. A unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a capacidade da enzima em catalisar a desmetilação de pectina correspondente a 1 nKat de NaOH.g⁻¹ de matéria fresca.

2.3 Poligalacturonase (PG)

A enzima foi extraída em a partir de cerca de 50 gramas de amostra de casca e polpa, preparadas em triplicatas. Cada amostra foi triturada em politron com 100 mL com água destilada. O extrato foi levado à centrifuga a 8000xg por 10 minutos. O resíduo foi ressuspenseo em 50 mL de NaCl 1 M, ajustado o pH para 6,0 e novamente levado à centrifuga a 2000xg por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade enzimática utilizando técnica preconizada por Pressey & Avants (1983), pela incubação do extrato enzimático bruto não dialisado com solução de ácido poligalacturônico (0,25% em tampão acetato de sódio 37,5 mM, pH 5,0), a 30°C, por 3 horas. A reação foi interrompida em banho-maria fervente. Os grupos redutores liberados foram determinados segundo a técnica de Somogyi adaptada por Jen & Robinson (1984). A unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a capacidade da enzima em catalisar a formação de um nKat de açúcar redutor.g⁻¹ de matéria fresca.

2.4 Composição de açúcares neutros

A extração e fracionamento do material de parede celular foram feitos a partir de uma amostra composta de 50 frutos (polpa e casca separadamente). Cerca de 30 a 40 g de tecido de cada amostra foram trituradas em politron com 50 mL de etanol 80% a quente e levadas à centrifugação a 2000xg por 12

minutos. Repetiu-se o procedimento anterior e descartou-se o sobrenadante. O resíduo foi lavado com 100 mL de água destilada, centrifugado a 2000xg por 12 minutos e descartado o sobrenadante. Ao material foram adicionados 50 mL de tampão 50mM de KH_2PO_4 e NaH_2PO_4 , ajustado o pH para 4,5 e feita a desamidação acrescentado amiloglicosidade (EC 3.2.1.3) e três gotas de tolueno para evitar a atividade microbiana. Após 24 horas sob agitação em banho-maria a 55° C, foi submetido à fervura por 5 minutos, resfriado em banho de gelo e novamente levado à centrifugação a 2000xg por 12 minutos e os sobrenadante descartados. No resíduo proveniente da extração enzimática foi realizado teste com KI/I_2 para confirmação da ausência de amido.

O resíduo foi lavado duas vezes com 30 mL de éter de petróleo, três vezes com 30 mL de clorofórmio:metanol (2:1) e, finalmente, com 3 mL de acetona e deixado secar por 8 horas em dessecador a vácuo. O material desengordurado e despigmentado foi submetido a duas extrações com água destilada a 10° C por 1 hora, seguidas de centrifugações a 2000xg por 12 minutos. Os sobrenadantes coletados formaram a fração solúvel em água fria. Ao resíduo adicionaram-se 50 mL de água quente, mantendo-se em banho a 80° C por 1 hora, sendo essa operação repetida mais uma vez. O sobrenadante foi coletado por centrifugação a 2000xg por 12 minutos e denominado fração solúvel em água quente.

Com o objetivo de extrair a lignina do material utilizou-se procedimento preconizado por Yamaki et al. (1979). O resíduo foi ressuspensionado em 30 ml de NaClO_2 (6mg/mL), corrigido o pH para 4,0 e mantido em banho a 70° C por 1 hora, sob agitação. Em seguida, foi levado centrifugação a 5000xg por 15 minutos. Esse procedimento foi repetido por mais uma vez. Os sobrenadantes foram descartados.

Ao resíduo deslignificado fez-se extração com 30 mL de solução quelante de sal 50mM de CDTA (ciclohexano-*trans*-1,2-diaminotetracético) em

acetato de sódio 50 mM, pH 6,5 a 25° C, deixado sob agitação por uma noite e então centrifugado a 5000xg por 12 minutos. Esse procedimento foi repetido por mais uma vez. Os sobrenadantes provenientes das duas extrações foram reunidos, originando a fração solúvel em CDTA.

O resíduo da extração anterior foi ressuspensionado em 50 mL de KOH 4M contendo 100mM de NaBH₄ e deixado extrair por uma noite em atmosfera de nitrogênio. Em seguida fez-se centrifugação a 5000xg por 12 minutos. O procedimento foi repetido por mais uma vez. Os sobrenadantes foram neutralizados com ácido acético glacial 50% em banho de gelo, e levados à centrifugação a 5000xg por 12 min. Os sobrenadantes foram reunidos, e denominados fração solúvel em KOH.

A amostra do extrato de cada estágio foi dialisada em membrana Spectra/Por (limite de exclusão de 6-8 KDa) contra água destilada por 48 horas, com trocas a cada 12 horas e liofilizadas. A composição de açúcares neutros de cada fração foi quantificada após derivatização (Alberschein *et al.* 1967), por meio de um cromatógrafo a gás CG Varian 3800, com coluna OV-DB 225 de 30m e 0,25 mm de diâmetro. O resultado expresso em porcentagem de ramnose (Ran), fucose (Fuc), arabinose (Ara), xilose (Xyl), manose (Man), galactose (Gal) e glicose (Glc) no extrato liofilizado.

2.5 Uronídeos totais

Partiu-se de 5 mg do material de parede celular fracionado, correspondente às frações extraídas em água fria, CDTA e KOH, previamente dialisado e liofilizado. Os ácidos urônicos foram determinados por colorimetria com uso de carbazol e leitura a 530nm, segundo metodologia preconizada por Bitter & Muir (1962). Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido urônico na respectiva fração de material de parede celular.

2.6 Açúcares neutros totais

Foram determinados por reação com antrona (Dische, 1955). Partiu-se de 5 mg do material de parede celular fracionado, correspondente às frações extraídas em água fria, CDTA e KOH. O material previamente dialisado e liofilizado foi doseado por colorimetria a 625 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de açúcares neutros na respectiva fração de material de parede celular.

2.7 Cálcio ligado à fração CDTA

As análises foram realizadas a partir de 50 mg da fração CDTA das porções casca e polpa em cada estágio de desenvolvimento do fruto. Após digestão nitroperclórica, o teor de cálcio foi determinado em espectrofotômetro de absorção atômica, conforme metodologia descrita por Sarruge & Haag (1974). Os resultados foram expressos em porcentagem de cálcio na fração CDTA.

2.8 Perfil do peso molecular de polímeros da fração CDTA

Mudanças no perfil de polissacarídeos extraídos na fração CDTA foram monitoradas por cromatografia de exclusão molecular (Redgwell et al., 1991), utilizando uma coluna Sepharose CL-6B (Pharmacia, Suécia) que possui faixa de fracionamento para dextranas de 10 a 1000 kDa, medindo 1,6 x 70 cm, calibrada com dextranas grau padrão (Fluka, Suíça). Utilizou-se como tampão de corrida uma solução de ácido acético/acetato de sódio 50mM, pH 5,0, contendo 0,1% de NaCl. Amostras foram dissolvidas no tampão de corrida (10mg/2mL) e aplicadas à coluna com fluxo de 20mL/hora e coletadas frações de 2 mL. O perfil de ácidos urônicos foi determinado por meio da técnica de McCready & McComb (1952), com uso de carbazol a 530 nm (Bitter & Muir, 1962). Os açúcares neutros foram determinados por reação com antrona (Dische, 1955).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Firmeza do fruto, atividade da PME e PG

Houve redução na firmeza dos frutos, com decréscimo significativo até 45 dias após o florescimento da planta. Não se observou diferença na firmeza entre os frutos dos dois últimos estádios de maturação. A atividade da PME na casca elevou-se até 45 dias, quando, então, entrou em decréscimo, enquanto que a atividade da PG foi detectada apenas a partir de 40º dia. Na polpa, a atividade da PME foi maior aos 30 dias, apresentando tendência de queda nos estádios seguintes. A PG na polpa apresentou atividade somente no 40º dia, quando o fruto ainda encontrava-se verde (Tabela 1).

Vários estudos indicam que a atividade destas duas enzimas ocorre de forma complementar ou conjugada. A PME atua desesterificando o substrato péctico, permitindo a ação da PG. Há, ainda, muita controvérsia a respeito de que a atividade da PG seja dependente de uma anterior ação da PME e, mesmo com avançados estudos de expressão gênica, essa questão ainda permanece não esclarecida. Hadfield & Bennett (1998) e Hadfield et al. (1998) citam que ocorrem diferentes isoformas de PME e PG em diferentes fases do desenvolvimento da planta e, em alguns frutos, dificultando sobremaneira a compreensão da regulação gênica como também do papel dessas enzimas. Há também evidências de que a ausência da ação, tanto da PME quanto da PG, não impediu o amaciamento em frutos .

TABELA 1. Firmeza, PME e PG, em função do estágio de desenvolvimento e porção do fruto. Lavras, MG, UFLA, 2002.

Estádio (dias após o florescimento)	Firmeza (N)	PME (nKat.g ⁻¹ matéria fresca)		PG (nKat.g ⁻¹ matéria fresca)	
		Casca	Polpa	Casca	polpa
30 (fruto verde)	40,18 a	13,37 (± 1,71)	7,64 (± 1,19)	ND	ND
35 (fruto verde)	36,3 b	11,52 (± 1,23)	-	ND	ND
40 (fruto verde)	27,61 c	12,88 (± 0,66)	2,04 (± 0,49)	0,03 (± 0,02)	0,09 (± 0,03)
45 (fruto mudando cor)	17,11 d	19,29 (± 1,92)	1,78 (± 0,14)	0,26 (± 0,05)	ND
50 (fruto maduro)	17,60 d	12,27 (± 3,70)	2,46 (± 0,22)	0,07 (± 0,05)	ND

Obs: desvio padrão entre parênteses

* ND = Não detectado

3.2 Composição de açúcares neutros em frações da parede celular

A composição de açúcares neutros não celulósicos nos extratos do material de parede celular é apresentada nas Figuras 1 e 2. Açúcares extraídos em água fria (Fig.1, a e b) e água quente (Fig. 1, c e d) são predominantemente componentes da fração péctica da PC celular não covalentemente, associados ou ionicamente ligados, por isso mais facilmente removíveis. Os açúcares mais

fortemente ligados ao polímero péctico foram extraídos com solução quelante de sal ciclohexano-*trans*-1,2-diaminotetraacético (CDTA) 50mM (Fig. 2, a e b). Açúcares neutros da fração hemicelulose foram extraídos em álcali forte, com solução de KOH 4M (Figura 2c e d).

Nas frações pécticas (água fria, água quente e CDTA), observaram-se maiores concentrações de galactose e de arabinose, sugerindo a predominância de polímeros do tipo arabinogalactanas. Maiores concentrações desses açúcares foram encontradas na casca. Este resultado é semelhante ao de Magalhães et al. (1996a) que também verificaram que a casca da jabuticaba possui maior concentração de pectina que a polpa. Na fração hemicelulose (KOH 4M) predominaram altas concentrações de glicose e xilose, açúcares que formam polímeros de xiloglicanas.

Semelhante ao verificado por Magalhães et al.(1996b) em jabuticaba, outros autores também têm observado aumento do teor de pectina na PC e perda de açúcares neutros na fração pectina durante o amadurecimento, principalmente galactose, arabinose e ramnose. Na jabuticaba, as perdas mais acentuadas de galactose foram observadas naquelas frações extraídas em água fria e água quente.

Na fração solúvel em CDTA da casca, as concentrações de galactose, arabinose e ramnose elevaram-se até atingir o nível máximo por volta de 40 dias, apresentando decréscimo no estágio seguinte (45 dias) e novo acréscimo ao final

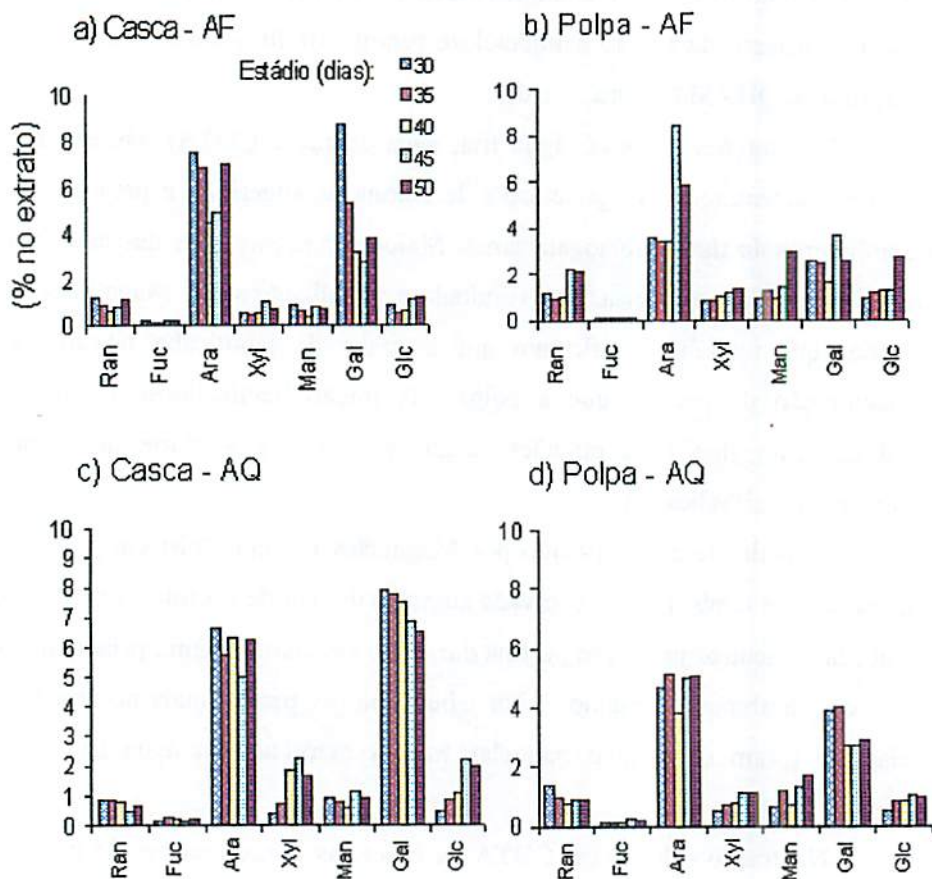


FIGURA 1. Açúcares neutros nas frações água fria (a e b) e água quente (c e d), em função do estágio de desenvolvimento e da porção do fruto. Lavras, MG, UFPA, 2002.

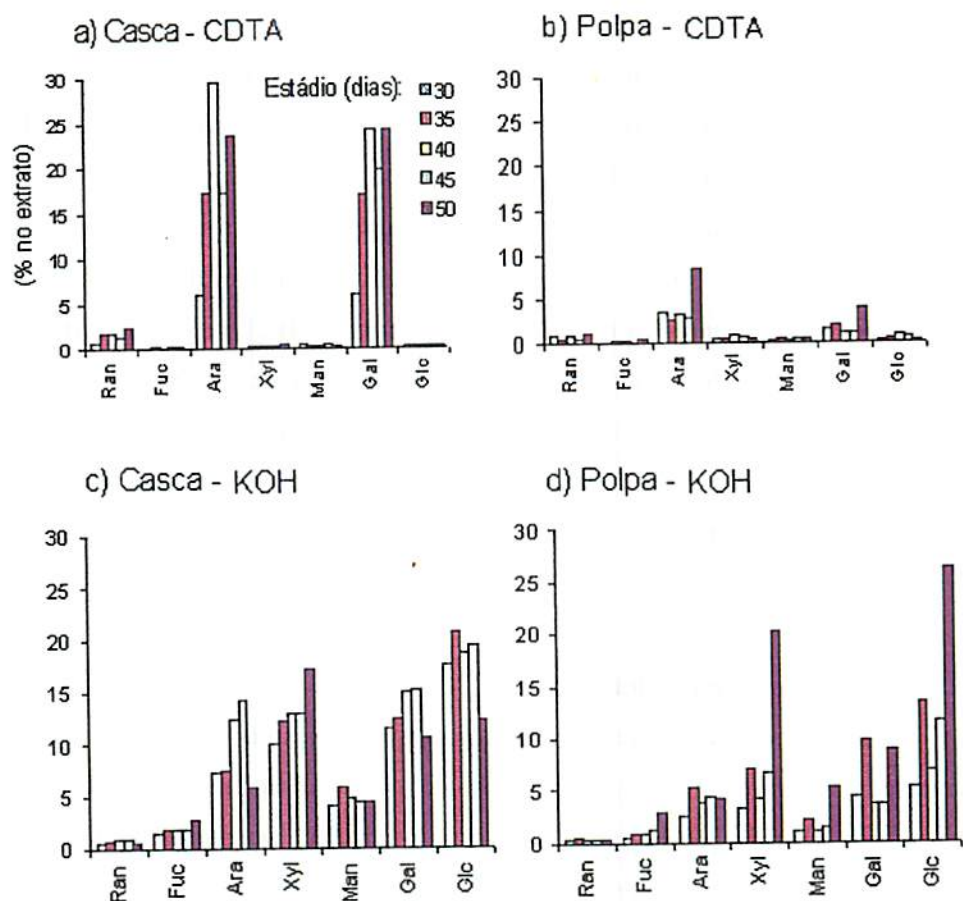


FIGURA 2. Açúcares neutros nas frações CDTA 50Mm (a e b) e KOH 4M (c e d), em função do estágio de desenvolvimento e da parte do fruto de jaboticabeira. Lavras, MG, UFLA, 2002.

do período (50 dias). A fração CDTA da polpa apresentou pequena flutuação de galactose, arabinose e ramnose até 45 dias, quando então ocorreu elevação na concentração desses açúcares (aos 50 dias).

Os dados sugerem que, durante o desenvolvimento do fruto, provavelmente ocorre uma redistribuição de açúcares, principalmente da galactose, que é o principal componente em todas as frações pécicas. Verifica-se que a perda de galactose observada nas frações água fria e água quente é compensada por nova síntese de açúcares e, possivelmente, resulta na formação de polímeros menos ramificados e de peso molecular mais elevado. Isso reflete a marcante elevação de galactose, arabinose e ramnose na fração CDTA das porções casca e polpa. A elevação dos níveis desses açúcares deu-se no intervalo de 45 a 50 dias após o florescimento e equivale aos estádios em que ocorre o amadurecimento do fruto.

3.3 Urônídeos e açúcares totais

A concentração de ácidos urônicos totais na fração água fria na casca e na polpa apresentou tendência de elevação até o 45º dia, seguida de decréscimo no 50º dia (Tabela 2 e Figura 3). No extrato em água quente os resultados indicaram pouca variação no período estudado. Ocorreu elevação de ácidos urônicos na fração CDTA da casca até o 40º dia, com redução no 45º dia e nova elevação no 50º dia; já na polpa, houve significativa perda no período de amadurecimento do fruto, entre os estádios que equivalem a 45º ao 50º dia. Vários estudos relatam a tendência de queda na concentração de uronídeos totais durante o amadurecimento de frutos (Dick & Labavitch, 1989; Yoshioka et al., 1992; Nunan et al., 1998). Neste estudo, a redução desse componente, que ocorre marcadamente nas frações água fria e CDTA da polpa, sugere a

ocorrência de modificações que se relacionam à solubilização da pectina da matriz da PC, aspecto relatado por Magalhães et al. (1996b).

Não ocorreram variações importantes no teor de ácidos urônicos na fração KOH da casca e polpa até o 45º dia após o florescimento. Ao final do período estudado, houve aumento considerável de ácidos urônicos da polpa, que pode estar refletindo o aumento do teor de galactose na fração KOH, conforme observado na Figura 2. É possível também que a alta concentração de ácidos urônicos na fração hemicelulose tenha ocorrido devido à contaminação com material correspondente a substâncias pécticas não totalmente extraídas nos procedimentos anteriores, tal como é sugerido em fracionamento de PC de abacaxi (Bartolomé & Rupérez, 1995) e mamão (Manrique, 2001). Redgweel et al. (1991; 1992) verificaram que a fração hemicelulose de extrato de parede celular de kiwi apresenta teor de galactose e ácido galacturônico na proporção de 2:1, mesmo que precedida de extrações consecutivas dos polissacarídeos pécticos com soluções de CDTA e carbonato de sódio.

Os níveis relativos da concentração de açúcares neutros totais apresentaram flutuações e resultaram em regressão não significativa (Tabela 2 e Figura 4), exceção feita à composição da fração KOH da polpa, que apresentou acentuada elevação ao final do período de desenvolvimento (50 dias). Tal elevação refletiu o aumento na concentração de açúcares neutros não celulósicos, principalmente glicose, xilose e galactose na fração KOH, determinado por meio de cromatografia gasosa (Figura 1, D).

TABELA 2. Uronídeos totais e açúcares neutros totais (Média ± desvio padrão) nas frações extraídas em água fria (AF), CDTA e KOH de jabuticaba em diversos estádios de desenvolvimento (n = 4) . Lavras, MG, UFLA, 2002.

Fração	Estádio (dias após floração)				
	30	35	40	45	50
	Uronídeos totais (% de ácido galacturônico no extrato)				
Casca – AF	30,37 c	49,59 b	58,01 a	56,11 a	53,26 b
AQ	57,33 a	35,94 b	37,70 b	27,39 c	37,97 b
CDTA	22,39 b	31,21 a	30,67 a	23,47 b	31,99 a
KHO	60,93 b	60,80 b	72,05 a	70,07 a	51,60 c
Polpa – AF	37,97 b	43,01 c	54,47 a	49,16 b	29,82 a
AQ	26,68 c	29,24 c	47,38 a	32,85 b	33,50 b
CDTA	32,09 a	13,05 c	23,82 b	17,95 b	12,61 c
KOH	32,06 c	43,59 b	28,91 c	30,68 c	82,11 a
Açúcares neutros totais (% de glicose no extrato)					
Casca – AF	8,67 a	9,81 a	11,89 a	9,90 a	10,64 a
AQ	19,25 a	9,74 b	13,84 b	11,67 b	13,56 b
CDTA	6,46 c	20,25 a	17,14 a	11,50 b	9,74 b
KOH	41,93 b	45,24 b	50,34 a	48,95 a	47,73 a
Polpa – AF	8,14 a	9,70 a	10,36 a	11,27 a	12,18 a
AQ	8,16 a	10,49 a	11,28 a	10,94 a	11,40 a
CDTA	5,74 a	5,49 a	6,29 a	4,96 a	4,33 a
KOH	25,34 b	22,62 b	21,74 b	20,21 b	65,40 a

Obs: letras indicam diferenças estatísticas entre estádios (5% Scoth Knot).

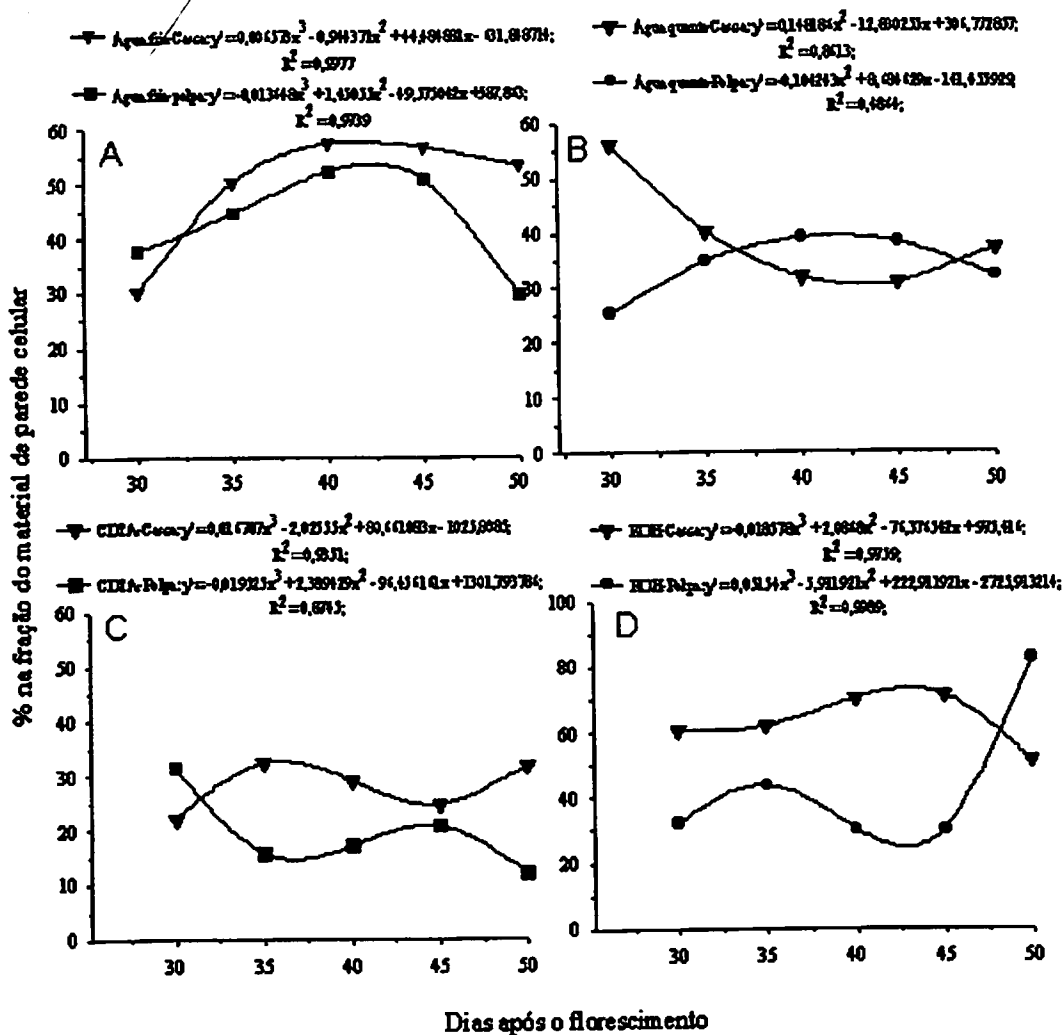


FIGURA 3. Uronídeos totais, em % de ácido galacturônico, nas frações água fria (A), água quente (B), CDTA (C) e KOH (D), em função do estágio de desenvolvimento e da parte do fruto de jaboticabeira. Lavras, MG, UFLA, 2002.

$$\nabla \text{ Água Fria Cava: } y = 1,29 \cdot 10^{-3} x^3 - 0,157316 x^2 + 0,82443 x - 87,32533$$

$$R^2 = 0,440;$$

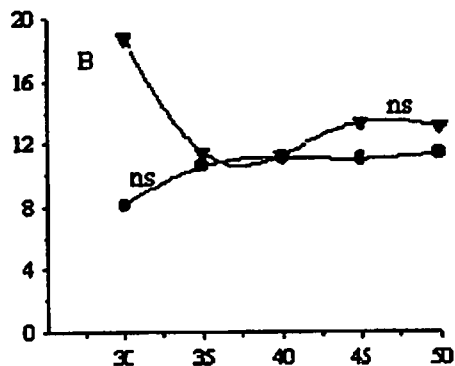
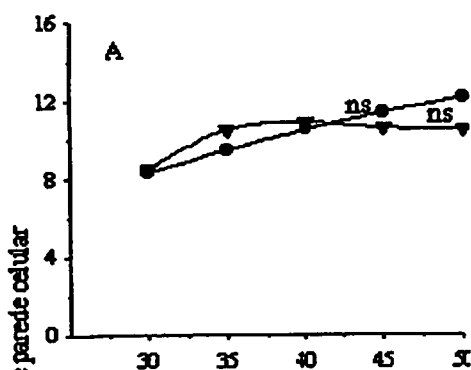
$$\bullet \text{ Água Fria Polpa: } y = 0,133 x + 2,0103 \quad R^2 = 0,986;$$

$$\nabla \text{ Água quente Cava: } y = -0,37910^{-3} x^3 + 0,82172 x^2 - 34,845736 x + 108,47373$$

$$R^2 = 0,782;$$

$$\bullet \text{ Água quente Polpa: } y = 11,3790^{-4} x^3 - 0,284679 x^2 + 0,180119 x - 110,87228$$

$$R^2 = 0,928;$$

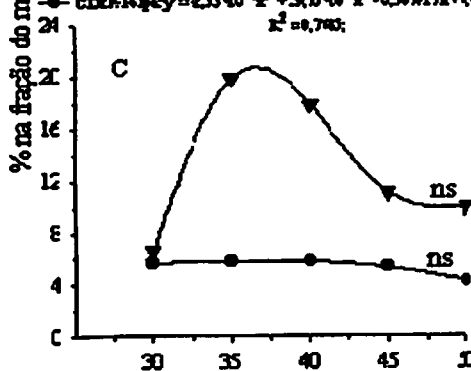


$$\nabla \text{ CDTA Cava: } y = 101,382 x^2 - 1,0872 x^3 + 72,59324 x - 97,16784$$

$$R^2 = 0,987;$$

$$\bullet \text{ CDTA Polpa: } y = 6,3390^{-4} x^3 + 0,20916^{-3} x^2 - 0,38717 x + 1,031$$

$$R^2 = 0,745;$$

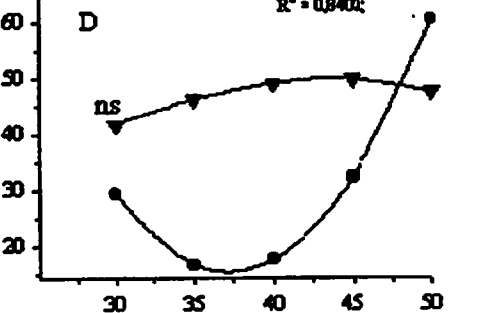


$$\nabla \text{ KOH Cava: } y = -0,04425 x^2 + 3,880886 x - 34,28376$$

$$R^2 = 0,925;$$

$$\bullet \text{ KOH Polpa: } y = 0,271889^{-2} x^2 - 20,16685 x + 390,32285$$

$$R^2 = 0,840;$$



Dias após o florescimento

FIGURA 4. Açúcares neutros totais, em % de glicose, nas frações água fria (A), água quente (B), CDTA (C) e KOH (D), em função do estágio de desenvolvimento e da parte do fruto de jaboticabeira. Lavras, MG, UFPA, 2002.

3.4 Cálcio ligado à fração CDTA

A concentração de cálcio ligado à fração CDTA na casca e na polpa do fruto apresentou flutuação no decorrer do período estudado. A menor concentração, tanto na casca como na polpa, ocorreu aos 40 dias após o florescimento (Tabela 1 e Figura 5).

TABELA 1. Porcentagem de cálcio ligado à fração CDTA na casca e polpa da jabuticaba em função dos estádios de desenvolvimento (Média \pm desvio padrão). Lavras, MG, 2002.

Estádio (dias após o florescimento)	Cálcio ligado (% na fração CDTA)	
	Casca	Polpa
30	0,72 \pm 0,07	0,68 \pm 0,25
35	0,57 \pm 0,10	0,67 \pm 0,18
40	0,45 \pm 0,12	0,48 \pm 0,15
45	0,57 \pm 0,17	0,67 \pm 0,14
50	0,64 \pm 0,14	0,58 \pm 0,12

Obs: média \pm desvio padrão

Comparando-se os teores de cálcio ligado à fração CDTA com a atividade da enzima poligalacturonase, verifica-se que a atividade da PG na polpa somente foi detectada no estágio em que o cálcio encontra-se na menor concentração. Na casca, a atividade da PG também não foi detectada aos 30 e 35 dias, momento em que a concentração de cálcio apresenta-se mais elevada.

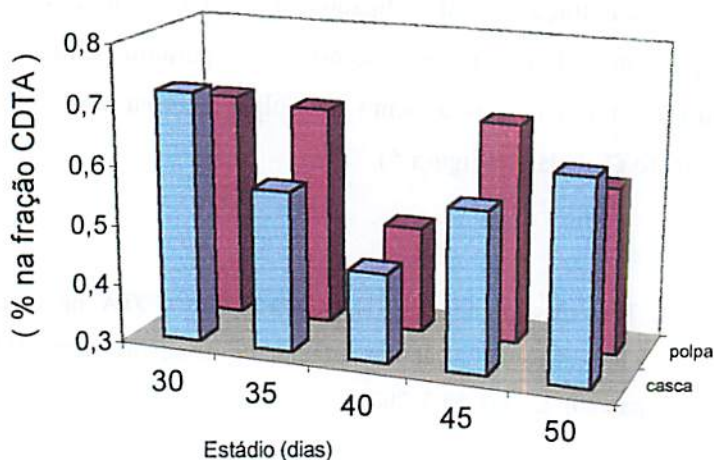


FIGURA 5. Cálcio ligado à fração CDTA na casca e polpa da jabuticaba em função do estágio de desenvolvimento. Lavras, MG, 2002.

A não detecção da PG ou sua baixa atividade no período caracterizado como a fase de amadurecimento do fruto (45 a 50 dias) sugere a existência de algum mecanismo genético que impede a transcrição do codificador mRNA para a síntese da PG, ou então o bloqueio da ação da enzima devido à formação da estrutura conhecida como “egg box”, que são agregados de galacturonatos desesterificados envolvendo o cálcio. Nessa segunda possibilidade, possivelmente a redução no grau de esterificação das pectinas promovida pela PME (Tabela 1) resultou na formação de blocos de resíduos de galacturonatos ionizados ligados ao cálcio, dificultando o acesso da PG ao componente péctico da parede e impedindo o rompimento de ligações covalentes entre ácidos galacturônicos.

3.5 Perfil do peso molecular de polímeros na fração CDTA

O perfil por cromatografia de exclusão molecular utilizando gel Sepharose CL 6B (Pharmacia) é apresentado nas Figuras 5 a 8. A determinação da concentração de ácidos urônicos e açúcares neutros foi realizada nos estádios correspondentes a 35, 40 e 50 dias após o florescimento.

Em geral, os resultados não demonstraram redução no perfil do peso molecular dos uronídeos. Na casca, verifica-se discreto deslocamento do perfil em relação à região de peso molecular intermediário. No perfil da polpa observou-se que há maior concentração de poliuronídeos na região de alto peso molecular quando o fruto encontra-se no final do período estudado (50° dia).

O perfil dos polissacarídeos expresso em açúcares neutros também não configurou redução do peso molecular dos polímeros pécticos presentes nas frações CDTA. Na polpa verificou-se a mesma tendência observada em relação aos ácidos urônicos, ou seja, no estádio correspondente ao 50° dia após a florescimento ocorreu expressivo aumento na concentração de açúcares neutros na região de maior peso molecular.

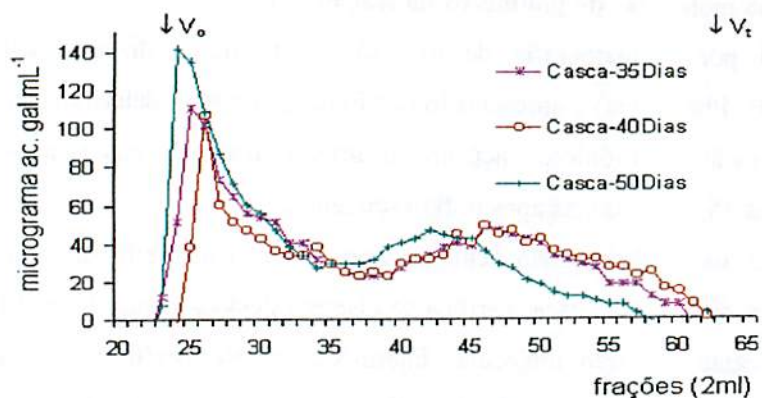


FIGURA 5. Perfil cromatográfico em coluna Sepharose CL-6B do peso molecular dos uronídeos extraídos na fração CDTA da casca de jaboticaba em três diferentes estádios de desenvolvimento. Lavras, MG, UFLA, 2002.

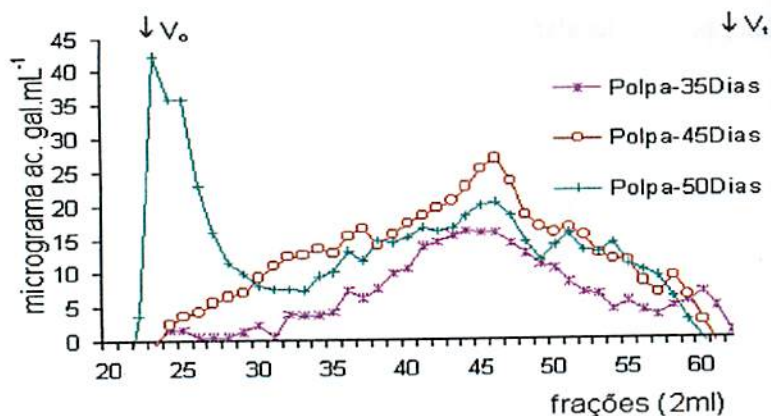


FIGURA 6. Perfil cromatográfico em coluna Sepharose CL-6B do peso molecular dos uronídeos extraídos na fração CDTA da polpa de jaboticaba em três diferentes estádios de desenvolvimento. Lavras, MG, UFLA, 2002.

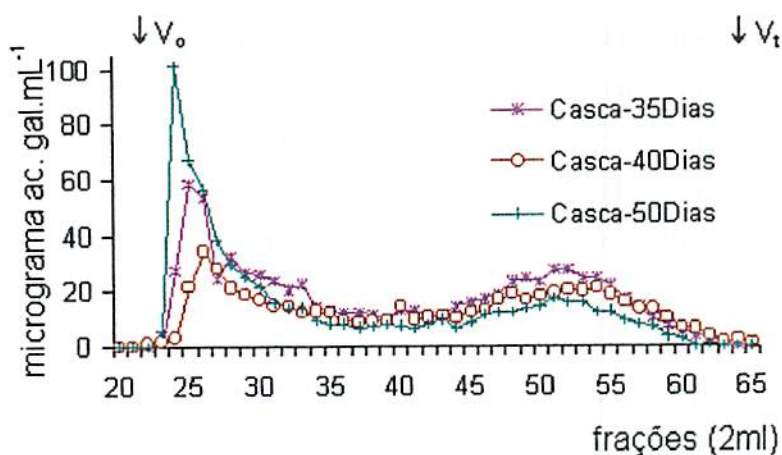


FIGURA 7. Perfil cromatográfico em coluna Sepharose CL-6B do peso molecular dos açúcares extraídos na fração CDTA da casca de jaboticaba em três diferentes estádios de desenvolvimento. Lavras, MG, UFLA, 2002.

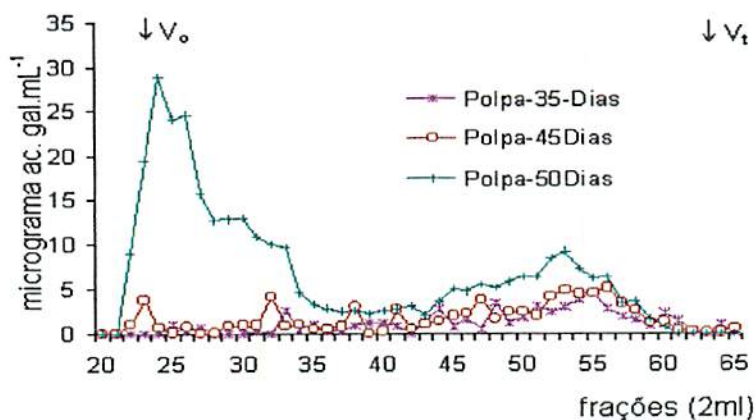


FIGURA 8. Perfil cromatográfico em coluna Sepharose CL-6B do peso molecular dos açúcares extraídos na fração CDTA da polpa de jaboticaba em três diferentes estádios de desenvolvimento. Lavras, MG, UFLA, 2002.

A análise dos resultados dos perfis não permite identificar mudanças no perfil de polissacarídeos que possam ser considerados como indicadores da ocorrência de despolimerização de pectinas da matriz. Isso ocorre, possivelmente, devido ao estágio de desenvolvimento do fruto das amostras analisadas. Os frutos quando estavam nos estádios correspondentes ao 35° e 40° dias ainda encontravam-se verdes, em fase de crescimento, possivelmente em expansão celular e envolvidos em intenso processo de síntese de PC. Portanto, ainda não encontravam-se propriamente em fase de amadurecimento. Já aos 50 dias, os frutos apresentavam-se maduros no estágio apropriado para consumo, ao mesmo tempo em que ainda não encontravam-se em franco processo de senescência, dificultando uma melhor caracterização do processo catabólico relacionado à PC, ou seja, nesse período os frutos haviam mudado de coloração caracterizada como “preta” (50 dias) e encontravam-se na fase inicial de amadurecimento.

4 CONCLUSÕES

A firmeza dos frutos apresentou marcada redução no período estudado, estabilizando, no final do desenvolvimento, quando então o fruto muda de coloração (45 dias, coloração “verde rajado”) e amadurece (50 dias, “vinho-escuro”).

A composição das frações pécticas extraídas em água fria, água quente e CDTA 50 mM mostraram predominância de galactose, arabinose e ramnose.

Na fração hemicelulose extraída com KOH 4M predominaram glicose e xilose, observando-se também concentrações intermediárias de galactose, manose e fucose.

Durante o desenvolvimento do fruto ocorreu intensa redistribuição de açúcares na matriz de PC, principalmente galactose, arabinose e ramnose que são os principais componentes em todas as frações pécticas.

A atividade da PME na casca apresentou elevação até 45 dias, quando então entrou em declínio aos 50 dias. Na polpa, a enzima apresentou maior atividade aos 35 dias, seguindo tendência de queda até o final do período estudado. Em todos os estádios, a casca do fruto apresentou maior atividade da PME.

Na casca do fruto, a PG foi detectada somente a partir do 40º dia após o florescimento. Na polpa, a atividade da PG somente foi detectada no 40º dia. A baixa atividade da PG na casca e sua ausência na polpa aos 45 e 50 dias após o florescimento, é indicativo de que outras enzimas hidrolases atuam promovendo a despolimerização da fração péctica da PC, na fase de amadurecimento do fruto.



5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS, R.S.; FINGER, F.L.; MAGALHÃES, M.M. Changes in non-structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. *Scientia Horticulturae*, Oxford, v.66, p.209-215, 1996.
- BARTOLOMÉ, A.P.; RUPÉREZ, P. Polysaccharides from the cell walls of pineapple fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v.43, p.608-612, 1995.
- DICK, A.J.; LABAVITCH, J.M. Cell wall metabolism in ripening fruit. IV. Characterization of the pectic polysaccharides solubilized during softening of Bartlett pear fruit. *Plant Physiology*, Rockville, v.89, p.1394-1400, 1989.
- HADFIELD, K.A.; BENNET, A.B. Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiology*, Rockville, v.117, p.337-343, 1998.
- HADFIELD, K.A. et al. Polygalacturonase gene expression in ripe melon fruits supports a role for poligalacturonase in ripening-associated pectin disassembly. *Plant Physiology*, Rockville, v.117, p.363-373, 1998.
- JEN, J.J.; ROBINSON, M.L.P. Pectolytic in sweet bell peppers (*Capsicum annum* L.). *Journal of Food Science*, Chicago, v.9, n.4, p.1045-1084, 1984.
- MANRIQUE, G.D. Caracterização parcial dos polissacarídeos da parede celular, suas transformações e correlação com o amaciamento pós-colheita de mamões (*Carica papaya* L. cv. Sunrise Solo). 2001. 117p. Tese (Doutorado)-Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MAGALHÃES, M.M.; BARROS, R.S.; FINGER, F.L. Changes in structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. *Scientia Horticulturae*, Oxford, v.66, p.17-22, 1996a.
- MAGALHÃES, M.M.; BARROS, R.S.; LOPES, N.F. Growth relations and pigment in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. *Journal Horticultural Science*, Ashford, v.71, n. 6, p.925-930, 1996b.
- NUNAN, K.J. et al. Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiology*, Rockville, v.118, p.783-792, 1998.

PRESSEY, R. β -galactosidase in ripening tomatoes. **Plant Physiology**, Rockville, v.71, p.132-135, 1983.

REDGWEEL, R.J.; MELTON, L.D.; BRASCH, D.J. Cell-wall polysaccharides of kiwifruit (*Actinida deliciosa*): effect of ripening on the structure features of cell-wall materials. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.209, p.191-202, 1991.

REDGWEEL, R.J. et al. Structures of the pectic polysaccharides from the cell walls of kiwifruit. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.226, p.287-302, 1992.

YAMAKI, S.; MACHIDA, Y.; KAKIUCHI, N. Changes in cell wall polysaccharides and monosaccharides during development and ripening of Japanese pear fruit. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v.20, p.311-321, 1979.

YOSHIOKA, H.; AOBA, K.; KASHIMURA, Y. Molecular weight and degree of methoxylation in cell wall polyuronide during softening in pear and apple fruit. **Journal American Society Horticultural Science**, Geneva, v.117, p.600-606, 1992.

CAPÍTULO 3

RESUMO

LIMA, Herbert Cavalcante de. Atividade, extração e purificação da β -galactosidase da Jabuticaba [*Plinia trunciflora* (Berg) Kausel - MYRTACEAE]. _____. Modificações de carboidratos estruturais e de enzimas pécicas em jabuticaba [*Plinia trunciflora* (Berg) Kausel - MYRTACEAE]. 2002. p.46-61. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

O objetivo desse trabalho foi investigar a atividade da β -galactosidase em diferentes estádios da desenvolvimento da jabuticaba, bem como purificá-la e determinar a seqüência de peptídeos da extremidade N-terminal. As determinações foram realizadas na casca (exocarpo) e polpa (mesocarpo) de frutos analisados em cinco estádios: I – colhidos 35 dias após o florescimento da planta (fruto verde), II – 45 dias (fruto imaturo mudando de cor, “menos que 50% “rajado”), III – 47 dias (fruto imaturo mudando de cor, “mais que 70% rajado”), IV – 50 dias (fruto maduro, cor preta) e V – 50 dias e armazenados por três dias a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ (fruto maduro, cor escura em senescência). A β -galactosidase apresentou elevada atividade no início do período estudado, decrescendo em seguida (até o estágio III) para então apresentar um pico no estágio IV (fruto maduro) e novo decréscimo quando em senescência (estágio V). O procedimento utilizado para a purificação da enzima resultou um fator de purificação de 16 vezes. Os passos da purificação foram acompanhados por eletroforese em gel SDS-PAGE e confirmados por imunoenensaio de western blot. A eletroforese indicou a presença de bandas, na faixa de 90 kDa e 60 kDa. Três isoformas da enzima foram isoladas por HPLC em fase reversa e determinada por seqüências N-terminal.

Orientador: Adimilson Bosco Chitarra - UFLA

ABSTRACT

LIMA, Herbert Cavalcante de. Activity, extraction and purification of the β -galactosidase of Jaboticaba fruit [*Plinia trunciflora* (Berg) Kausel-MYRTACEAE]. : _____. Modificações de carboidratos estruturais e de enzimas pécicas em jaboticaba [*Plinia trunciflora* (Berg) Kausel – MYRTACEAE]. 2002. p.46-61. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

The objective of that work was to investigate the activity of the β -galactosidase in different stadiums of the development of the jaboticaba, as well as you purify her and to determine the sequence of peptídeos of the extremity N-terminal. The determinations were accomplished in the peel (exocarpo) and pulp (mesocarpo) of fruits analyzed at five stadiums: I - harvested 35 days after the blossom of the plant (green fruit), II - 45 days (immature fruit changing of color, " less than 50% striped "), III - 47 days (immature fruit changing of color, " more than 70% striped "), IV - 50 days (ripe fruit, black color) and V - 50 days and stored 3 days to $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ (ripe fruit, dark color, in senescência)). The β -galactosidase presented high activity in the beginning of the studied period, decreasing soon afterwards (until the stadium III) for then to present a pick in the stadium IV (ripe fruit) and new decrease when in senescência (stadium V). The procedure used for the purification of the enzyme, it resulted a factor of purification of 16 times. The steps of the purification were accompanied by eletroforese in gel SDS-PAGE and confirmed by of western blot. The eletroforese indicated the presence of two bands, in the strip of 90 kDa and 60 kDa. Three isoformas of the enzyme were isolated for HPLC in reverse phase and the determinate sequences N-terminal.

Adviser: Adimilson Bosco Chitarra – UFLA

1 INTRODUÇÃO

O curto período de vida pós-colheita da jabuticaba tem sido apontado como um dos fatores que dificultam a ampliação do consumo dessa Mirtácea. Ainda não está claro quais fatores fisiológicos e bioquímicos contribuem para a rápida perda de firmeza e deterioração que ocorrem com o amadurecimento do fruto. Algumas mudanças durante o desenvolvimento do fruto já foram estudadas por Barros et al. (1996) e Magalhães et al. (1996 a ; b).

Em frutos, a perda de firmeza decorrente de processos fisiológicos tem sido atribuída à ação de enzimas hidrolases de carboidratos estruturais, que degradam, principalmente, pectinas e hemiceluloses. Em estudo apresentado no Capítulo 2, foram pesquisadas algumas mudanças químico-estruturais e bioquímicas no decorrer do desenvolvimento do fruto. Verificou-se que o fruto apresentou marcada redução na firmeza quando verde, estabilizando ao final do período estudado (45 e 50 dias após a floração), fase em que os frutos amadureceram e mudaram de coloração.

A caracterização dos açúcares neutros nas frações pécticas da PC, extraída em água fria, água quente e CDTA indicou intensa redistribuição de açúcares durante o desenvolvimento do fruto, principalmente da galactose que é o principal componente em todas as frações. Houve maior perda de galactose nas frações água fria e água quente. Sugeriu-se que essa perda é compensada por nova síntese de açúcares e na formação de polímeros menos ramificados e de peso molecular mais elevado, que refletiram no marcante aumento de galactose, arabinose e ramnose na fração CDTA das porções casca e polpa. A elevação dos níveis desses açúcares ocorreu no intervalo de 45 a 50 dias após o florescimento e equivale à fase de amadurecimento do fruto.

Visando entender o processo de perda de firmeza do fruto, compararam-se as informações relativas à composição de carboidratos estruturais com a

atividade das enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase. Os dados coletados e comparados sugerem que a baixa atividade da poligalacturonase na casca e sua ausência na polpa, quando o fruto encontra-se com 45 (“verde rajado”) e 50 dias (maduro) após a floração, é indicativo de que outras hidrolases devem atuar promovendo a despolimerização da fração péctica da PC fase de maturação.

Vários estudos indicam evidências científicas que a enzima β -galactosidase (EC 3.2.1.23) possui papel importante no amadurecimento de frutos. A enzima atua como uma exo-galactanase, hidrolisando ligações do tipo β -(1,4) em galactanas e promovendo a liberação de galactose em diferentes frações da parede celular (Carrington & Pressey, 1996; Carrey et al.,1995). Segundo Pressey (1983), a atuação da β -galactosidase na fase inicial do amadurecimento do fruto está relacionada à sua capacidade de promover desestruturação na matriz de parede, principalmente devido à desramificação de galactanos e arabinanos de cadeias laterais que ligariam os esqueletos de ramnogalacturonanos pécticos às hemiceluloses.

Este trabalho teve por objetivo investigar a atividade da β -galactosidase da jabuticaba em cinco diferentes estádios de desenvolvimento, bem como purificá-la e determinar a seqüência de peptídeos da extremidade N-terminal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização das determinações, os frutos foram colhidos em pomar doméstico localizado em Lavras, MG, Brasil, na safra de outubro/novembro de 2001. Os dados meteorológicos referentes ao início do florescimento da planta (03/09/2001) até a colheita de frutos maduros (23/10/2001) foram coletados pelo Setor de Meteorologia da Universidade Federal de Lavras. No mês de setembro, a temperatura máxima registrada foi 25,5°C, a média 19,1 °C e a mínima 15,0 °C; a precipitação pluviométrica total no mês foi 109,0 mm; a umidade relativa média 72,0% e a taxa média de insolação 5,6 horas/dia. Em outubro, a temperatura máxima chegou a 30,4°C, a média a 23,0°C e a mínima a 17,2 °C; a precipitação pluviométrica total foi igual a 25,2 mm; a umidade relativa média 61,0% e a taxa média de insolação 7,7 horas/dia. De acordo com a classificação de Köppen, a cidade de Lavras, MG possui clima do tipo Cwa e está localizada a 45° W GRW de longitude, a 21° 14' sul de latitude e encontra-se a 918,87 metros de altitude.

As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas do Departamento de Biologia da UFLA, na casca (exocarpo) e polpa (endocarpo) de frutos em cinco diferentes estádios: I – colhidos no dia 08/10/2001, 35 dias após a florescimento da planta (fruto verde); II – colhidos em 18/10/2001, 45 dias (fruto imaturo mudando de cor, “menos que 50% rajado”); III – colhidos em 20/10/2001, 47 dias (fruto imaturo mudando de cor, “mais que 70% rajado”); IV – colhidos em 23/10/2001, 50 dias (fruto maduro, cor escura) e V – colhidos em 23/10/2001, 50 dias (fruto maduro, cor escura) e armazenados três dias em temperatura ambiente (23±2°C). Após a colheita, os frutos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e encaminhados ao Laboratório. Todo o procedimento laboratorial foi conduzido sob controle da temperatura (4°C).

No preparo do extrato bruto para a determinação da atividade da enzima “in vitro”, partiu-se de 30 gramas de polpa e de casca. O material foi homogeneizado por dois minutos em politron com 40ml de tampão extrator polietilenoglicol (PEG 8000) 12% contendo 0,2% de metabissulfito de sódio, levado à centrifugação (17.000xg/30min), descartado o sobrenadante e lavado o resíduo com 40ml de água destilada. Repetiu-se centrifugação e lavagem por mais duas vezes. O precipitado resultante foi ressuscitado com 80 ml de tampão acetato de sódio 0,1M com 1M NaCl, pH 4,5 e deixado sob agitação por uma hora e, em seguida, centrifugado a 8.000xg/15min. O sobrenadante foi coletado, completado o volume para 100 ml e dialisado contra o tampão anterior por 48 horas, com troca de tampão a cada 8 horas. A reação enzimática deu-se na mistura composta de 0,4ml de solução BSA 0,1%, 0,4ml do correspondente substrato (*p*-nitrofenil derivado do β -D-galactopiranosídeo, Sigma), 0,2-0,6ml de tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,5 e 0,2 a 0,6ml do extrato enzimático, resultando em um volume final de 1,6ml. Antes da adição do extrato bruto, a mistura foi incubada a 37°C por 10min, adicionou-se então o extrato bruto e deixou-se sob atuação da enzima por mais 15 minutos. A reação foi paralisada com 2,0ml de Na₂CO₂ 0,2M e o *p*-nitrofenol formado foi determinado em A₄₁₅. O resultado calculado utilizando-se curva padrão de *p*-nitrofenol (Sigma) e expresso como nmol *p*-nitrofenol formado por segundo por grama de matéria fresca (nKat.g⁻¹mf).

Na purificação da β -galactosidase partiu-se de 300g de casca no estágio V (50 dias após o florescimento, fruto maduro), seguindo procedimento descrito anteriormente. O extrato bruto resultante foi ressuscitado com 100 ml de tampão acetato de sódio 0,1M com 1M NaCl e levado à centrifugação (25.000xg por 15 minutos). O precipitado resultante foi ressuscitado, precipitado em sulfato de amônio até concentração de 2,8M e centrifugado a 27.000xg/15min. O

precipitado foi ressuspenso em 100ml de tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,6 e dialisado contra solução 1M de sulfato de amônio por 48 horas.

A enzima foi purificada utilizando uma seqüência de duas colunas cromatográficas. Inicialmente a amostra foi aplicada em uma coluna Phenyl-Sepharose CL 6B (Pharmacia) equilibrada com solução de sulfato de amônio 1M sob fluxo de 90ml.h⁻¹. Após aplicação da amostra, fez-se passar NaCl em gradiente que variou de 1M a 0,1M. As frações ativas foram dialisadas contra tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,6 concentradas por liofilização para 2ml e aplicadas em coluna pré-empacotada Sephacryl S-200 (Pharmacia), equilibrada com o mesmo tampão, sob fluxo de 18ml.h⁻¹. Em ambas as colunas, coletaram-se frações de 6ml, fez-se leitura a A₂₈₀ e determinou-se a atividade da β -galactosidase.

Na determinação de proteína total utilizou-se o método de Bradford, com padrão de BSA. A eletroforese em SDS-PAGE foi realizada na amostra desnaturada, de acordo com Laemmli (1970), utilizando sistema minigel Bio Rad. Para confirmação da presença da β -galactosidase no extrato purificado, fez-se teste Western blot quimiluminescente, em membrana de nitrocelulose, utilizando anticorpo anti- β -galactosidase (Sigma), e anti-coelho conjugado à peroxidase (Roche), de acordo com Towbin et al. (1979).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade da β -galactosidase em ambas as porções apresentou elevada atividade no início do período estudado, decrescendo, em seguida, para então apresentar um pico que coincide com o estágio IV (momento em que o fruto encontra-se maduro) e seguindo novo decréscimo até o estágio final estudado (Tabela 1 e Figura 1). O decréscimo da atividade na enzima no estágio V (fruto colhido maduro e armazenado em temperatura ambiente por 3 dias) sugere a ocorrência de reações catabólicas características de senescência.

A β -galactosidase apresentou-se mais expressiva em dois momentos (estádios I e IV). Sua alta atividade no estágio I (fruto verde, com 35 após o florescimento), possivelmente, está relacionada a mecanismos de expansão celular nesse período de crescimento do fruto. O pico manifestado no estágio IV (fruto maduro, no ponto apropriado para colheita e consumo) sugere que esta enzima possui papel relevante na fase de amadurecimento da jabuticaba.

No experimento cujo resultado é apresentado no Capítulo 2, verificou-se que a poligalacturonase não apresenta atividade na polpa do fruto em estádios que correspondem ao período de 45 e 50 dias após a floração. A alta atividade da β -galactosidase nesse período é indicio de que, possivelmente, esta enzima possui um papel chave na despolimerização da fração pectina da parede celular do fruto.

TABELA 1. Valores médios para atividade da β -galactosidase na casca e polpa do fruto da jabuticabeira em diferentes estádios. U = nKat.g⁻¹ de matéria fresca. Lavras-MG: UFLA, 2002.

Estádio (dias após floração)	Firmeza (N)	β -galactosidase (nKat.g ⁻¹)	
		Casca	Polpa
I (35 dias, fruto 100 % verde)	36,4 a	1.61 aB	2.44 aA
II (45 dias, fruto < 50% “rajado”)	26,5 b	0.44 eB	0.86 cA
III (47 dias, fruto > 50 % rajado)	15,6 c	0.58 dB	0.72 dA
IV (50 dias, fruto maduro)	18,4 c	1.39 bA	0.97 bB
V (50 dias, armazenado 3 dias após a colheita, em senescencia)	5,0 d	0.72 cA	0.68 dA

Obs: médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são estatsticamente iguais (5% Scott Knott).

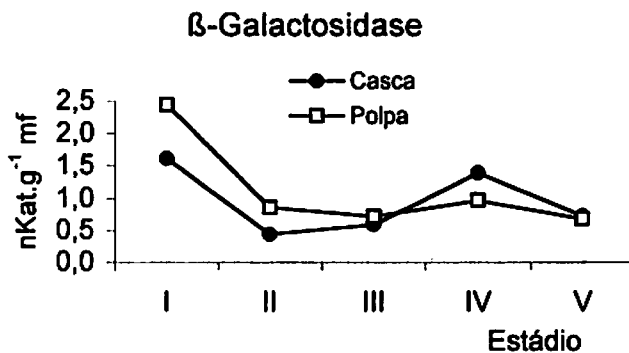


FIGURA 1. Atividade da β -galactosidase na casca e polpa da jaboticaba em cinco diferentes estádios de desenvolvimento. Lavras, MG. UFLA, 2002.

TABELA 2. Etapas de purificação da β -galactosidase extraída de jaboticaba. Lavras, MG. UFLA, 2002.

Passos da purificação	Proteína total (mg)	Ativ. total (nKat)	Ativ. espec. (nKat.mg ⁻¹)	Fator de purificação	Recuperação (%)
Extrato bruto	378	53,50	0,14	1	100
Tampão Na ₂ PO ₄	75,68	25,30	0,33	2,38	19,8
(NH ₄) ₂ SO ₄	67,43	89,30	1,32	9,43	17,6
Phenyl Sepharose	1,96	3,34	1,70	12,14	0,51
Sephacryl S-200	0,67	1,28	2,24	16,00	0,15

O procedimento utilizado para a purificação da enzima, resultou um fator de purificação de 16 vezes (Tabela 2). Os passos da purificação foram acompanhados por eletroforese em gel SDS-PAGE e confirmado pelo imunoensaio de western blot (Figura 2). A eletroforese indicou a presença de duas bandas da enzima na faixa de 90 kDa e uma outra de peso molecular inferior na faixa de 60 kDa (Figura 2).

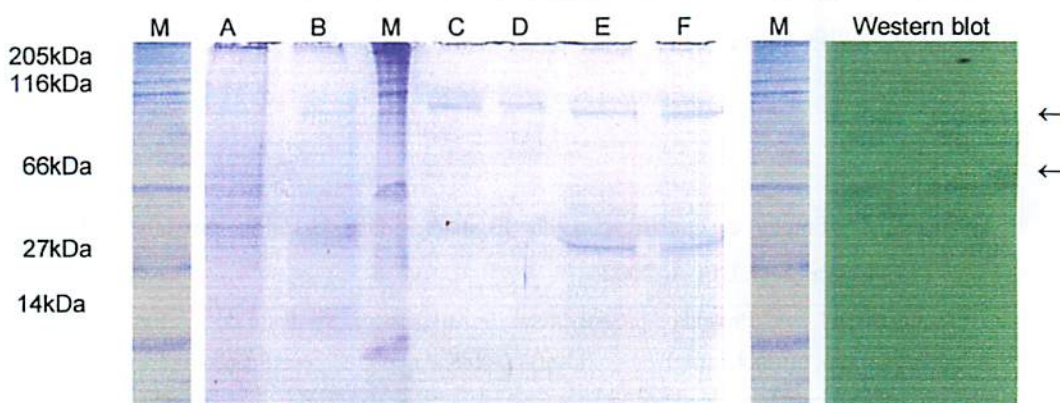


FIGURA 2. Eletroforese em SDS-PAGE e Western Blot, da β -galactosidase extraída de casca de jabuticaba no estágio maduro (M=marcador, A=extrato bruto, B= $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, C e D=Sephacryl S-200, E e F=Phenyl Sepharose CL-6B. Lavras, MG. UFLA, 2002.

Várias isoformas de β -galactosidase já foram extraídas e caracterizadas em manga (Ali et al.,1998), abacate (DeVeau et al., 1993), tomate (Pressey, 1993) e mamão (Ali et al., 1998). Em trabalho recente, Ali et al. (1998) purificaram e caracterizaram três isoformas de β -galactosidase de mamão. A forma molecular que predominou durante o amadurecimento do fruto foi denominada β -II que, em SDS-PAGE, apresentou 67KD e parece estar relacionada ao amaciamento da polpa do fruto. Estudo com tomate indicou três isoformas no fruto, denominadas por Carey et al.(1995) como β -I (125 kDa), β -II (61 kDa) e β -III (72 kDa). Esses valores se apresentaram muito próximos àqueles encontrados por Pressey (1983) para o mesmo fruto. O peso molecular das isoformas de β -galactosidase identificadas na jabuticaba, determinado por SDS-PAGE, apresenta-se na faixa do que foi encontrado para outros frutos carnosos.

Para a caracterização da seqüência de peptídeos a partir da extremidade N-terminal da β -galactosidase, partiu-se de amostra resultante das frações ativas após passagem na coluna S-200. O material apresentou alta concentração de sal derivado de amônia. Por isso, a primeira tentativa de seqüenciamento não foi satisfatória. Possivelmente, a presença de amônia tenha mimetizado o N-terminal da molécula e dificultado o procedimento analítico. Partiu-se, então, para a desalifcação da amostra. Optou-se por usar um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - HPLC em fase reversa, adaptado com coluna C18 m-Bondapack analítico (5mm 0.39 x 300 cm). O tampão de equilíbrio usado foi o TFA 0,1%. A amostra foi eluída em um gradiente de acetonitrila em presença de 0,025% de ácido trifluoroacético (TFA) e a corrida monitorada a A_{214} . As frações de amostras ativas para a enzima foram eluídas na faixa 60% a 70% de acetonitrila.

O procedimento adotado garantiu boa dissolução da amostra e a corrida desenvolveu-se dentro da normalidade. O resultado confirmou a purificação de

três isoformas de β -galactosidase (Figura 3). As três isoformas isoladas apresentaram as codificações de seqüências :

Beta1: DPDRQRQQMQDRP...

Beta2: EPDRNEQQMQSDE...

Beta3: NDDRNRQQMWSDGAPS...

Verifica-se, então, que as isoformas caracterizadas apresentam a seguinte seqüência de peptídeos:

Beta1:

Asp, Pro, Asp, Arg, Gln, Arg, Gln, Gln, Met, Gln, Gln, Asp, Arg, Pro

Beta2:

Glu, Pro, Asp, Arg, Asn, Glu, Gln, Gln, Met, Gln, Gln, Ser, Asp, Glu

Beta3:

Asn, Asp, Asp, Arg, Asn, Gln, Met, Trp, Trp, Ser, Asp, Gly, Ala, Pro, Ser

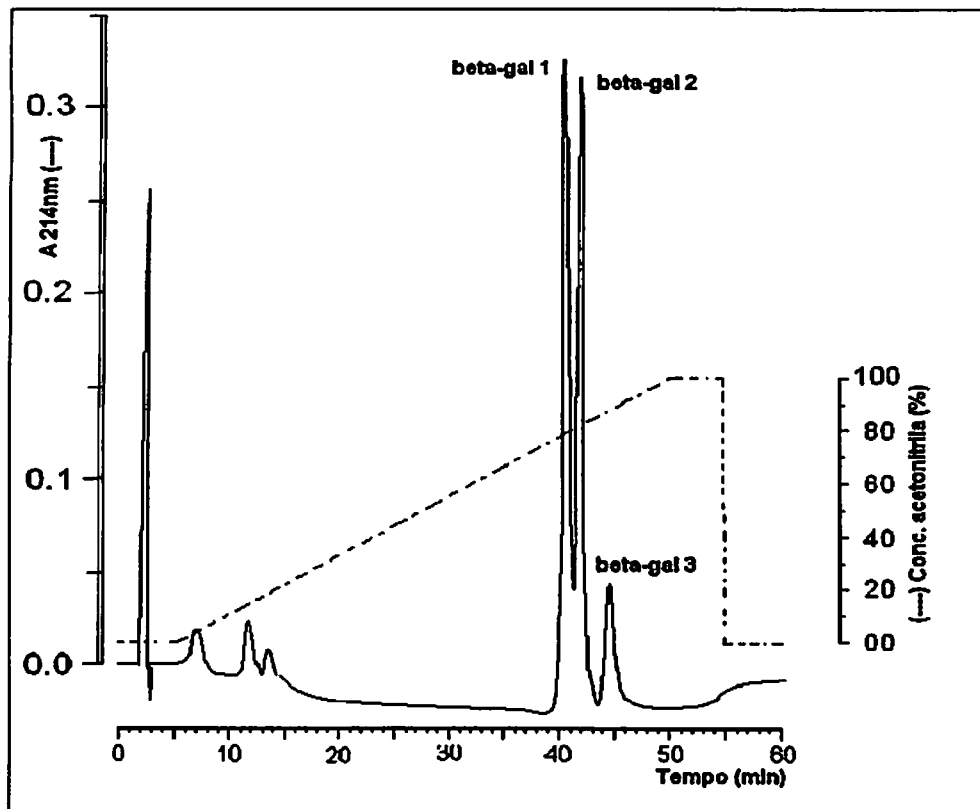


FIGURA 3. Purificação de três isoformas de β -galactosidase de fruto de jaboticaba maduro (sistema HPLC fase reversa). Lavras, MG, UFLA, 2002.

4 CONCLUSÕES

Na jaboticaba, a atividade da β -galactosidase apresentou-se mais expressiva em dois momentos, os quais coincidiram com os estádios em que o fruto encontra-se na fase de crescimento (fruto verde, no 35º dia após o florescimento da planta) e no início da fase de amadurecimento (50º dia).

O sistema cromatográfico adaptado para purificação da β -galactosidase mostrou-se eficiente e resultou na identificação de três isoformas da enzima no fruto maduro.

O procedimento utilizado para a purificação da enzima resultou em um fator de purificação de 16. O teste de Western blot confirmou a presença de duas bandas da enzima purificada: uma na faixa de 90 kDa e outra de peso molecular inferior na faixa de 60 kDa.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, Z.M. et al. Isolation, characterization and significance of papaya β -galactosidase to cell wall modification and fruit softening during ripening. **Physiology Plantarum**, Kobenhavn, v.104, p.105-115, 1998.

BARROS, R.S.; FINGER, F.L.; MAGALHÃES, M.M. Changes in non-structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, Oxford, v.66, p.209-215, 1996.

CAREY, A.T. et al. Tomato exo-(1-4) α -D-galactosidase. Isolation, changes during ripening in normal and mutant tomato fruit and characterization of a related cDNA clone. **Plant Physiology**, Rockville, v.108, p.1099-1107, 1995.

DeVEAU, E.J.I. et al. Degradation and solubilization of pectin by β -galactosidase purified from avocado mesocarp. **Physiology Plantarum**, Kobenhavn, v.87, p.279-285, 1993.

MAGALHÃES, M.M.; BARROS, R.S.; FINGER, F.L. Changes in structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, Oxford, v.66, p.17-22, 1996a.

MAGALHÃES, M.M.; BARROS, R.S.; LOPES, N.F. Growth relations and pigment in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Journal Horticultural Science**, Ashford, v.71, n. 6, p.925-930, 1996b.

PRESSEY, R. β -galactosidase in ripening tomatoes. **Plant Physiology**, Rockville, v.71, p.132-135, 1983.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some application. **Proc. Nat. Acad. Science, USA** . v. 76, p. 4350-4354. 1979.