



SAMIRA HADDAD SPILLER

**PECTINA DE GOIABA: AVALIAÇÃO DE
MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE
ESTERASES DURANTE O AMADURECIMENTO
(SOLUBILIZAÇÃO DE MEMBRANAS E
ELETROFORESE)**

LAVRAS – MG

2012

SAMIRA HADDAD SPILLER

**PECTINA DE GOIABA: AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E
ANÁLISE DE ESTERASES DURANTE O AMADURECIMENTO
(SOLUBILIZAÇÃO DE MEMBRANAS E ELETROFORESE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química e Bioquímica de Produtos Naturais e Sintéticos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Custódio Donizete dos Santos

Coorientador

Dr. José Renato de Abreu

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Spiller, Samira Haddad.

Pectina de goiaba : avaliação de métodos de extração e análise de esterases durante o amadurecimento (solubilização de membranas e eletroforese) / Samira Haddad Spiller. – Lavras : UFLA, 2012.

101 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Custódio Donizete dos Santos.

Bibliografia.

1. *Psidium guajava*. 2. Enzimas. 3. Extrações. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.8044216

SAMIRA HADDAD SPILLER

**PECTINA DE GOIABA: AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E
ANÁLISE DE ESTERASES DURANTE O AMADURECIMENTO
(SOLUBILIZAÇÃO DE MEMBRANAS E ELETROFORESE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química e Bioquímica de Produtos Naturais e Sintéticos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 05 de julho de 2012.

Dra. Celeste Maria Patto de Abreu UFLA

Dr. Luiz Carlos de Oliveira Lima UFLA

Dra. Silvana Marcussi UFLA

Dr. Custódio Donizete dos Santos
Orientador

Dr. José Renato de Abreu
Coorientador

LAVRAS – MG

2012

*A minha sobrinha Sofia, a mais nova integrante da família, presente de Deus
que veio trazer mais alegria a nossa casa!*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a graça de chegar até aqui, por ter me dado forças, por dar muito mais do que eu mereço, e à Virgem Maria, pela intercessão poderosa.

Aos meus pais, Jamal e Jorge, pela vida, por todo amor e apoio, com os quais eu sempre pude contar sem sombra de dúvida.

À Grasiela e Grasiene, minhas irmãs, pela compreensão, paciência e orações.

Aos meus tios Meri, Antônio e Michel, por todo carinho e pelo amor de pais que sempre me ofereceram.

Ao meu namorado Diego, presente tão importante de Deus para mim, por se fazer presente de maneira especial e forte na minha vida.

Aos meus cunhados Flávio e Marcelo, pelos conselhos e carinho de irmãos que me deram.

À Ana Paula, Cynthia e Valquíria, minhas amigas-irmãs, por todos os bons momentos, pelo companheirismo e força recebidos.

Ao Vinícius, pela grande ajuda, por ter estado ao meu lado com toda a paciência.

À Estela, que me ajudou na colheita das goiabas, na montagem do experimento e nas análises estatísticas.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realização do mestrado.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, professor Custódio Donizete dos Santos, e ao Dr. José Renato de Abreu, meu coorientador, pela orientação e ensinamentos.

Aos professores do curso, pelo conhecimento que me transmitiram, e a todos os outros professores que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica e à Xulita, pelo companheirismo e solidariedade.

À Eliete e ao Fabrício, do Laboratório de Biologia Molecular, e à Cleusa, do Laboratório de Laticínios, por toda atenção e permissão para o uso de aparelhos.

Enfim, a todos os que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

“Pois sois meu Senhor, a quem apresento o fruto do meu trabalho.”

RESUMO

No Brasil, a cultura da goiaba apresenta grande importância socioeconômica, dadas às suas amplas e variadas formas de utilização. A goiaba é considerada um fruto bastante atrativo, em razão de sua delicada cor e agradável aroma, além de ser uma das mais completas e equilibradas frutas no que diz respeito ao valor nutritivo. Altamente perecível, devido ao seu intenso metabolismo durante o amadurecimento, a goiaba tem vida útil que pode chegar de 3 até 5 dias sob temperatura ambiente. As informações sobre os processos metabólicos e os teores de componentes estruturais durante o amadurecimento são bem contraditórias e não são claramente definidas. A firmeza dos frutos verdes e maduros são principalmente devido aos polímeros de pectina. A perda de firmeza durante o amadurecimento de goiaba é devido à atividade de enzimas hidrolíticas (esterases) que promovem intensa solubilização das pectinas constituintes da parede celular. Diante do exposto, o objetivo neste trabalho foi extrair pectina da polpa de goiaba durante o amadurecimento através de dois processos, e sugerir modificações para justificar a presença de maiores teores de pectina na polpa da goiaba, e comprovar sua principal responsabilidade pela manutenção da firmeza do fruto, bem como determinar a atividade de esterase em todos os dias de amadurecimento e estudar as isoenzimas esterásicas que possam estar envolvidas no rápido amaciamento através de eletroforese em gel de poliácrilamida. Foram colhidas goiabas no estágio “de vez” e armazenadas por 8 (dia 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) dias à temperatura de $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $78\% \pm 1\%$. Foram analisados dois métodos de extração: o método convencional, a partir do uso de etanol 95%, e um método de extração com EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético). A extração se mostrou mais eficiente quando se usou EDTA, onde o teor médio de pectina total detectado foi de 9,10%. A partir da execução de uma nova etapa de extração no método com etanol, o teor médio de pectina total foi de 7,63%. Os teores estimados foram maiores do que os citados na literatura, o que pode explicar melhor o papel da pectina na firmeza do fruto. Já a atividade da esterase foi determinada na polpa homogeneizada durante o amadurecimento e nas frações solúvel e de membrana das células da polpa. As esterases solúveis e solubilizadas por Triton X-100 foram submetidas à eletroforese em cilindro de gel de poliácrilamida. Os resultados obtidos mostraram uma alta atividade esterásica na polpa de goiaba com um pequeno aumento linear com o amadurecimento. Há um predomínio de esterase nas membranas celulares da polpa (84%) em relação à enzima solúvel (16%). A eletroforese da esterase mostrou grande número de isoenzimas, tanto na fração solúvel quanto na solubilizada, com grande semelhança na mobilidade da maioria dos picos, o que sugere que sejam essas esterases que, associadas à

pectinametilsterase, sejam as responsáveis pela perda de firmeza da polpa do fruto.

Palavras-chave: Amadurecimento de goiaba. Pectina. Métodos de extração. Esterase. Eletroforese.

ABSTRACT

In Brazil, the guava culture has a great socioeconomic importance, given its wide and varied forms of use. It is considered a very attractive fruit, due to its delicate color and pleasant aroma, and it is one of the most complete fruits in what concerns its nutritional value. However, it is a highly perishable fruit due to its intense metabolism during ripening. It has a very short shelf life, which can reach 3 to 5 days at room temperature. Information on the metabolic processes and the levels of structural components during ripening is contradictory and not clearly defined. The firmness of the green and ripe fruits is owing mainly to the pectin polymers. The loss of firmness during the guava ripening is a result of the activity of hydrolytic enzymes (esterases) that promote intense solubilization of pectin constituents of the cell wall. Based on the considerations above, the aim of this study was to extract pectin from the guava pulp during its ripening through the use of two methods, suggest modifications to justify the presence of higher pectin contents, and prove its main responsibility for maintaining the fruit firmness, as well as determining the esterase activity during ripening and studying the esterase isoenzymes that might be involved in the fast softening through electrophoresis in polyacrylamide gel. The fruits were harvested in an incomplete ripening stage and stored for 8 days (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) at the temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ and relative humidity of $78\% \pm 1\%$. Two extraction methods were analyzed: the conventional method (with 95% ethanol), and a method in which EDTA was used. The extraction was more effective when EDTA was used, and the total pectin content was 9.10%. From the implementation of a new stage in the method of extraction with ethanol, the average content of total pectin was 7.63%. The estimated contents were higher than the ones cited in the literature, which can better explain the role of pectins in the fruit firmness. The esterase activity was determined in the homogenized pulp during ripening and in the soluble and membrane fractions of the pulp cells. The soluble esterases and the ones solubilized by Triton X-100 were subjected to electrophoresis in polyacrylamide gel cylinder. The results showed a high esterase activity in the guava pulp with a small linear increase with ripening. There is a predominance of esterase in the cell membranes of the pulp (84%), as compared to the soluble enzyme (16%). The esterase electrophoresis showed a large number of isoenzymes both in the soluble and in the solubilized fraction, with a great similarity in the mobility of most peaks, which suggests that these esterases, associated to pectinmethylesterases, are responsible for the loss of firmness in the fruit.

Keywords: Guava ripening. Pectin. Extraction methods. Esterase. Electrophoresis.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1	Estrutura química do ácido poligalacturônico	26
Figura 2	Estrutura da homogalacturonana como um polímero linear de resíduos de ácido galacturônico unidos entre si por ligações α -(1,4).....	28
Figura 3	Estrutura do esqueleto da Ramnogalacturonana I e as respectivas cadeias laterais	29
Figura 4	Estrutura do esqueleto da Ramnogalacturonana II encontradas nas paredes de plantas.....	29
Figura 5	Galacturonanas substituídas: Xilogalacturonanas (B) e apiogalacturonanas (A).....	30
Figura 6	Estrutura do ácido acérico.....	30
Figura 7	Estrutura da apiose.....	30
Figura 8	Modo de ação enzimática das pectinases em uma molécula de pectina. PMGL: polimetilgalacturonato liase. PMG: Polimetilgalacturonase. PMGE: Polimetilgalacturonatoesterase (pectinaesterase). PGL: Poligalacturonato liase (pectato liase). PG: Poligalacturonase.....	45

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 2

Gráfico 1	Porcentagem de perda de massa de goiabas ‘Pedro Sato’ armazenadas em condições ambiente	67
Gráfico 2A	Superfície de resposta para análise da interferência do teor de pectina sobre o teor de açúcar	73
Gráfico 2B	Superfície de resposta para análise da interferência do teor de açúcar sobre o teor de pectina	73

CAPÍTULO 3

Gráfico 1	Atividade em mU/g de polpa fresca da esterase solúvel (S1), de membrana (SD1) e do homogeneizado (S1 + SD1)	88
Gráfico 2	Alteração relativa (%) da atividade da esterase com o amadurecimento	89
Gráfico 3	Atividade da esterase das frações solúvel (S1) e solubilizada (S2) nas frações do gel de eletroforese do 5º dia de amadurecimento	91
Gráfico 4	Atividade da esterase da fração solúvel (S1) nas frações do gel de eletroforese do 5º dia de amadurecimento	92
Gráfico 5A	Atividade da esterase nas frações do gel de eletroforese da fração solúvel (dia 0 de amadurecimento)	94
Gráfico 5B	Atividade da esterase nas frações do gel de eletroforese da fração solúvel (dia 1 de amadurecimento)	94
Gráfico 5C	Atividade da esterase nas frações do gel de eletroforese da fração solúvel (dia 2 de amadurecimento)	95
Gráfico 5D	Atividade da esterase nas frações do gel de eletroforese da fração solúvel (dia 3 de amadurecimento)	95
Gráfico 5E	Atividade da esterase nas frações do gel de eletroforese da fração solúvel (dia 4 de amadurecimento)	96
Gráfico 5F	Atividade da esterase nas frações do gel de eletroforese da fração solúvel (dia 5 de amadurecimento)	96
Gráfico 5G	Atividade da esterase nas frações do gel de eletroforese da fração solúvel (dia 6 de amadurecimento)	97
Gráfico 5H	Atividade da esterase nas frações do gel de eletroforese da fração solúvel (dia 7 de amadurecimento)	97

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Teores médios (em porcentagem) das frações de pectina solúvel (PS) e insolúvel (PI) de acordo com dois métodos distintos de extração durante o amadurecimento de goiabas cv. 'Pedro Sato'	69
Tabela 2	Teores médios (em porcentagem) da fração resíduo de pectina (RP) de acordo com dois métodos distintos de extração durante o amadurecimento de goiabas cv. 'Pedro Sato'	70
Tabela 3	Teores médios (em porcentagem) da fração pectina total (PT) de acordo com dois métodos distintos de extração durante o amadurecimento de goiabas cv. 'Pedro Sato'	71
Tabela 4	Açúcares totais (mg/100g) nas frações de pectina pelos métodos de Abreu (2010) e McCready e McCoomb (1952)	72

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Atividade da esterase em mU/g* de polpa fresca e de esterases no extrato homogeneizado, solúveis e de membrana.....	87
Tabela 2	Atividade de esterase de membrana solubilizada com Triton X-100 (mU/g de polpa fresca*)	89

LISTA DE SIGLAS

PG	Poligalacturonase
PGL	Poligalacturonato liase
PME	Pectinametilsterase
PMG	Polimetilgalacturonase
PMGL	Polimetilgalacturonato liase
PI	Pectina insolúvel
PS	Pectina solúvel
PT	Pectina total
RP	Resíduo de pectina
S1	Sobrenadante 1 (esterase solúvel)
S2	Sobrenadante 2 (esterase solubilizada)
SD1	Sedimento 1 (esterase de membrana)
SD2	Sedimento 2 (esterase não solubilizada)
SED	Sedimento
SOB	Sobrenadante

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	17
1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	Goiaba: Aspectos gerais	20
2.2	Características da cultivar ‘Pedro Sato’	23
2.3	Parede celular: aspectos gerais	23
2.4	Componentes da parede celular (YAPO, 2011)	24
2.4.1	Pectinas	24
2.4.2	Celulose	34
2.5	Maturação/amadurecimento	35
2.6	Mudanças no fruto decorrentes do amadurecimento	37
2.7	Açúcares ligados à parede celular	40
2.8	Enzimas da parede celular	41
2.9	Eletroforese: aspectos gerais	45
2.9.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida	47
	REFERÊNCIAS	48
	CAPÍTULO 2 Avaliação de métodos de extração de pectina de goiabas cv. ‘pedro sato’	57
1	INTRODUÇÃO	59
2	MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1	Procedência e colheita dos frutos	61
2.2	Preparo dos frutos	61
2.3	Preparo da amostra	61
2.4	Delineamento experimental	62
2.5	Análises	62
2.5.1	Perda de massa	62
2.5.2	Pectinas	62
2.5.2.1	Extração de pectinas com etanol 95% (MCCREADY; MCCOOMB, 1952)	63
2.5.2.1.1	Pectina insolúvel	63
2.5.2.1.2	Pectina solúvel	63
2.5.2.2	Extração de pectinas com solução de EDTA tetrassódico 2,0mM em pH 7,0 (ABREU, 2010)	64
2.5.3	Determinação de açúcares	65
2.5.4	Interferência de açúcares na análise de pectinas	65
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
3.1	Perda de massa dos frutos	66
3.2	Teores de pectina	68
4	CONCLUSÃO	74

	REFERÊNCIAS	75
	CAPÍTULO 3 Atividade da esterase durante o amadurecimento de goiabas cv. ‘pedro sato’: solubilização de membrana e eletroforese	79
1	INTRODUÇÃO	81
2	MATERIAL E MÉTODOS	83
2.1	Procedência e colheita dos frutos	83
2.2	Delineamento experimental e análise estatística	83
2.3	Extração de esterases para os ensaios de atividade enzimática durante os dias de amadurecimento	84
2.4	Determinação da atividade enzimática utilizando 1-naftilacetato e <i>Fast Blue RR Salt</i>	84
2.5	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	85
2.5.1	Extração de enzima para realização de eletroforese	85
2.5.2	Eletroforese	85
2.6	Determinação da atividade enzimática nas frações dos géis da eletroforese	86
2.6.1	Determinação colorimétrica usando <i>Fast Blue RR Salt</i> a 500 nm no 5° dia de amadurecimento	86
2.6.2	Determinação espectrofotométrica a 322nm em todos os dias de amadurecimento	86
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
4	CONCLUSÃO	98
	REFERÊNCIAS	99
	ANEXOS	101

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A fruticultura é um importante ramo da agricultura e é responsável pela produção de alimentos de alto valor nutritivo. Tendo em vista os aspectos econômicos e sociais, ocupa lugar de destaque no agronegócio, tornando-se preferência de um número cada vez maior de agricultores (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

A goiaba (*Psidium guajava* L.) é uma das frutas tropicais mais populares que são cultivadas e consumidas no mundo. As frutas são consumidas frescas e são largamente utilizadas na indústria alimentícia para a produção de frutas em conserva, geleias e sucos (PINO; QUERIS, 2011). A goiaba é apreciada não apenas pelo seu sabor e aroma característicos, mas também pelo valor nutritivo, além de suas potencialidades fitoquímicas no desenvolvimento de fitocosméticos (WATANABE et al., 2011).

Na goiaba, assim como na maioria das frutas, a firmeza da polpa é um atributo importante, por que, além de definir a qualidade do fruto para o consumo “*in natura*” e para o processamento, influencia a vida útil pós-colheita, interferindo na resistência ao transporte e ao ataque de microrganismos. Durante o amadurecimento, principalmente pela atividade das celulasas e pectinases, as fibras vão sendo hidrolisadas, acarretando redução de sua firmeza (MENDONÇA et al., 2007).

A firmeza dos frutos verdes e maduros são principalmente devido aos polímeros de pectina, que podem estar metilados e com graus variados de metilação (FERTONANI, 2006; KERTESZ, 1951), podem estar ligados a íons, principalmente Ca^{++} , que mantêm cadeias adjacentes unidas entre si, ou ainda

podem apresentar suas cadeias glicosídicas interligadas entre si por compostos fenólicos (CHITARRA; CHITARRA, 2005; TAIZ; ZIEGER, 2004).

O amolecimento dos frutos é geralmente associado à desestruturação da lamela média e da parede celular primária, que é composta por rígidas microfibrilas de celulose, mantidas juntas por meio de redes de hemicelulose e pectinas. As pectinas são um grupo de polissacarídeos naturais de superfície; são componentes estruturais de paredes celulares primárias de frutos e vegetais, usadas na indústria alimentícia como estabilizantes, espessantes e agentes gelificantes. Quimicamente, elas são compostas principalmente de ácido D-galacturônico, contendo ligações glicosídicas α -(1,4), em que se forma o ácido poligalacturônico (PEREZ et al., 2011).

No amadurecimento de frutas, o amaciamento dos tecidos é decorrente da ação de enzimas despolimerizantes, desmetoxilantes e hidrolíticas, como as enzimas pécticas, em conjunto com celulasas, hemicelulasas, β -galactosidades, entre outras. Entre elas, salientam-se as enzimas pécticas ou pectinolíticas, as quais catalisam a degradação de macromoléculas de pectinas constituídas por unidades de ácido galacturônico. As substâncias pécticas encontram-se, principalmente, depositadas na parede celular, atuando como material cimentante, sendo responsáveis pelas mudanças de textura dos frutos. As esterases catalisam a desertificação da pectina pela remoção dos grupos metoxil éster (CHITARRA; CHITARRA, 2005; ORTIZ; GRAELL; LARA, 2011). Mesmo com as contradições citadas na literatura com relação às enzimas PME e PG, os frutos da goiabeira amadurecem, ocorrendo todos os processos de amaciamento do fruto, reforçando a indicação de que a solubilização das pectinas seja também efetuada por outras enzimas diferentes. Em goiaba, não se encontra atividade de PG (ABREU, 2010; LINHARES et al., 2007) ou esta é muito baixa.

Há vários estudos relacionados à mudança nos teores de pectina em goiaba durante o seu amadurecimento; os mesmos estão em torno de 2,4% (BULK; BABIKER; TINAY, 1997; CARVALHO, 1999; CARVALHO et al., 2001; GIANONNI, 2000; LIMA, 2004; LINHARES et al., 2007; MENDONÇA et al., 2007; MOWLAH; ITOO, 1983; OSHIRO et al., 2008; PAL; SELVARAJ, 1979; VILA et al., 2007; XISTO et al., 2004) no entanto, essas quantidades de pectina não parecem condizentes com a responsabilidade principal de manter a firmeza dos frutos (ABREU et al., 2012).

Diante do exposto, o objetivo neste trabalho foi extrair pectina da polpa de goiaba durante o amadurecimento através de dois processos e sugerir modificações para justificar a presença de maiores teores de pectina na polpa da goiaba, e comprovar sua principal responsabilidade pela manutenção da firmeza do fruto, além de determinar a atividade de esterase em todos os dias de amadurecimento, e estudar as isoenzimas esterásicas que possam estar envolvidas no rápido amaciamento através de eletroforese em gel de poliacrilamida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Goiaba: Aspectos gerais

Psidium guajava L., popularmente conhecida como goiaba, pertencente à família *Myrtaceae*, é nativa da América tropical, mas muito conhecida pela grande adaptação e produção em diferentes locais do mundo (YAMAMOTO et al., 2010). Existem aproximadamente trezentas e vinte e quatro espécies de goiaba conhecidas nas regiões tropicais da América Central e América do Sul, distribuídas e cultivadas principalmente em países tropicais e subtropicais. Do gênero *Psidium*, as variedades mais difundidas são Paluma, Pedro Sato, Ogawa e Kumagai (LIMA et al., 2010).

A polpa da goiaba pode ser doce e apresentar uma coloração rosada forte, com sementes em número e firmeza variáveis, dependendo da espécie. A goiaba é rica em vitaminas A e C, omega-3 e omega-6, ácidos graxos poli-insaturados e, especialmente, altos níveis de fibra dietética. Uma única goiaba contém mais do que quatro vezes a quantidade de vitamina C de uma laranja, que é considerada fonte dessa vitamina. Também apresenta bons níveis de minerais que são necessários à dieta, tais como potássio e magnésio, e um amplo perfil de nutrientes essenciais. A goiaba é comercialmente utilizada na produção de sucos, geleias, sorvete, biscoitos e vários produtos de panificação, além de apresentar alto rendimento por hectare e polpa de elevada qualidade industrial. Fatias de goiaba seca estão também disponíveis em mercados comerciais no Sudeste da Ásia (ANDRADE et al., 2009; FERNANDES; RODRIGUES, 2011; MANICA et al., 2000).

Ainda de acordo com os mesmos autores, a goiaba é bem conhecida pela sua grande adaptação ao crescimento e produção de frutos em diferentes locais do mundo.

A faixa de temperatura ideal para a vegetação e a produção situa-se entre 25 e 30°C. O efeito limitante da temperatura depende especialmente das temperaturas mínimas absolutas. Quando o seu nível desce a menos de 0°C, sobrevêm geadas, prejudiciais a todas as fruteiras. Entretanto, em regiões onde ocorrem geadas brandas e as temperaturas de inverno não caem para além de 2°C negativos, ainda é possível cultivar comercialmente goiabeiras, embora possa ocorrer a destruição dos brotos novos, pelo frio. A goiabeira adulta, graças à sua vitalidade, se recupera rapidamente dos danos causados por geadas (GONZAGA NETO; SOARES, 1995).

Diferentes partes da planta são utilizadas no sistema indígena de medicina para o tratamento de várias doenças humanas, tais como feridas, úlceras e cólera. Investigações farmacológicas indicaram que a casca, fruto e folhas da goiaba apresentam atividades antibacterianas, hipoglicêmica, anti-inflamatória, analgésica, antipirética, espasmolítica e depressora do sistema nervoso central. No México, as folhas de goiaba são extensivamente utilizadas para conter diarreia, sendo que a quercetina e seus glicosídeos, em tal caso, são os compostos ativos. Os extratos em água, álcool e clorofórmio das folhas são efetivos contra *Aeromonas hydrophila*, *Shigella* spp., *Vibrio* spp, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* e *Mycobacterium phlei*. A goiaba também é largamente utilizada na medicina tradicional em todo o território da América Latina e ainda no Caribe para o tratamento de diarreia, desintéria, gastroenterite, dores estomacais e indigestão. A goiaba é usada para controle de diarreia e desintéria em países como China, Filipinas, Senegal e Estados Unidos; faz-se também uso da goiaba como antiespasmódico na Índia e em Gana; como antisséptico na China, e até mesmo como antibiótico nos Estados Unidos, e ainda para o tratamento contra amebas, no Congo. O chá feito das folhas da goiabeira também é bem conhecido, sendo que é usado para câimbras. É possível observar

que as folhas contêm aminoácidos, triterpenos e esteroides, ácidos, fenóis, saponinas e carotenos (BIRDI et al., 2010; LIMA et al., 2010).

A goiaba é uma fruta amplamente consumida no Brasil, sendo que é cultivada em grande parte do território nacional. Sua produção está concentrada principalmente nos Estados de São Paulo e Pernambuco, que detêm cerca de 70% da produção brasileira. Os frutos apresentam excelentes condições para exploração comercial, além de serem muito apreciados, devido às suas características organolépticas e nutricionais. Comparada com outras frutas, a goiaba vermelha oferece elevados teores de licopeno, e a goiaba branca, de vitamina C e fibras (PINTO et al., 2010).

As flores saem nos ramos novos, são brancas e perfumadas. Por isso mesmo, a goiabeira é uma das árvores que mais atrai insetos, sendo que a abelha doméstica é o principal polinizador das flores da goiabeira. A goiabeira começa a produzir com um ano a um ano e meio de idade, dependendo dos tratamentos culturais. Os frutos são bagos com tamanho, forma e coloração da polpa variável, dependendo da cultivar (GONZAGA NETO; SOARES, 1995).

A goiaba é bem conhecida por seu perfil de aroma agradável, abrangendo também notas de odor sulfuroso (SINUÇO et al., 2010).

A goiaba se sobressai em relação às outras frutas tropicais em produtividade e adaptabilidade. As cultivares de goiaba exibem uma grande diversidade quanto ao tamanho da árvore, hábitos de safra e rendimento de produção, bem como no tamanho do fruto, forma, qualidade e época de amadurecimento (SHARMA et al., 2010).

As frutas são uma importante fonte em dietas suplementares. A qualidade das frutas é determinada por uma ampla gama de características desejáveis, tais como valor nutricional, sabor, qualidade no processamento e vida de prateleira. Manipular a qualidade e a produção de frutos em geral requer um entendimento dos processos fundamentais que determinam a frutificação,

maturação e amadurecimento (BAPAT et al., 2010; WANG; GARTUNG, 2010).

2.2 Características da cultivar ‘Pedro Sato’

Pedro Sato é uma cultivar selecionada a partir de pés-francos, provavelmente originários de ‘*Ogawa* N° 1 Vermelha’, no Rio de Janeiro. Essa variedade foi desenvolvida no Rio pelo produtor de mesmo nome, na década de 1980. O produtor comprou mudas de goiaba branca enxertada. Do porta-enxerto cresceu uma planta com frutos vermelhos, a goiaba Pedro Sato de polpa vermelha. As plantas são vigorosas, de crescimento vertical, e razoavelmente produtivas. Os frutos são levemente ovalados, de boa aparência, de peso variável (entre 150 e 280 gramas), podendo atingir peso superior a 400 gramas; a casca é bem rugosa (característica associada a uma maior vida útil pós-colheita); a polpa é rosada, espessa, firme e com cavidade central cheia; o sabor é agradável e apresenta poucas sementes. Atualmente, é a cultivar de mesa de casca rugosa mais difundida no Estado de São Paulo (COMPANHIA DE ENTREPÓSITOS E ARMAZÉNS GERAIS DE SÃO PAULO - CEAGESP, 2010; PEREIRA; NACHTIGAL, 2003).

2.3 Parede celular: aspectos gerais

A presença de parede celular é uma característica intrínseca as células vegetais. Essa parede se desenvolve em camadas depositadas durante o seu crescimento. A célula vegetal apresenta parede primária e secundária, e uma lamela média, rica em pectato de cálcio, presente na junção das paredes de células vizinhas. A parede celular primária é formada na fase de crescimento, sendo considerada não especializada. Enquanto a parede celular secundária

forma-se após cessar o crescimento celular, e pode se tornar uma estrutura altamente especializada dependendo de sua localização. Dentre suas maiores funções estão sua essencialidade na maioria dos processos de crescimento, desenvolvimento, manutenção e reprodução, Além de ser responsável por: resistência mecânica das estruturas vegetais; promoção da junção das células; exoesqueleto, controlando a forma e permitindo altas pressões de turgor; e proteção contra agressões físicas e químicas (PAIVA; LIMA, 2009).

As células dos tecidos vegetais são circundadas por paredes celulares, as quais são fisicamente rígidas, fornecendo suporte mecânico aos diferentes tecidos. Nas plantas superiores, a parede celular é composta por três camadas denominadas lamela média, parede primária e parede secundária. A composição química e a estrutura física da parede celular variam entre espécies e cultivares (FERNANDES, 2000).

A parede celular de plantas é uma estrutura altamente dinâmica, composta de uma rede de hemiceluloses ligadas a microfibrilas de celulose, embebidas em uma matriz de polímeros pécticos e outros compostos menos abundantes, como fenóis, proteínas estruturais e enzimas (GOULAO; SOUZA; OLIVEIRA, 2007).

2.4 Componentes da parede celular (YAPO, 2011)

2.4.1 Pectinas

Dentre os polissacarídeos que as paredes celulares de plantas superiores apresentam, as substâncias pécticas são as mais complexas com respeito à organização estrutural e funcionalidade. As substâncias pécticas foram primeiramente descobertas no século XVIII no fruto do tamarindo como uma “substância peculiar”, mas não foi dado um nome específico até o século XIX,

quando uma caracterização bruta revelou que a mesma gelifica, tornando-se, desse modo, um componente ativo, responsável pela formação do gel. Como consequência, foi sugerido o nome “pectina”, em referência à palavra grega “*pektikos*”, que significa “coagular, solidificar ou coalhar” e também foi predito que a mesma teria importantes funções em todas as plantas e muitas aplicações em confeitaria. Todas essas predições estavam corretas, e as pectinas vêm sendo vigorosamente estudadas, tanto por cientistas na área de alimentos, quanto por cientistas na área de botânica (YAPO, 2011).

A fim de padronizar a nomenclatura e facilitar o entendimento das substâncias pécticas, em 1944 o comitê da *American Chemical Society* revisou e definiu estas substâncias complexas como: Substancias pécticas: consiste em todos os materiais que contem ácidos poligalacturônicos (Figura 1) em sua composição. Protopectina: consistem na forma natural da pectina, quando associada à celulose, hemicelulose e lignina. São pouco solúveis em água, e em presença de ácidos diluídos formam os ácidos pectínicos ou pécticos, de diferentes tamanhos moleculares e composição. Ácidos pécticos: são cadeias de ácidos galacturônicos totalmente livres de metoxilas e pouco solúveis em água. Ácidos pectínicos: termo usado para designar ácidos poligalacturônicos que contém uma proporção insignificante de grupos metil éster. Pectina: são ácidos pectínicos solúveis em água, com os grupos carboxilas do ácido galacturônico variavelmente esterificados com metanol (PAIVA; LIMA, 2009).

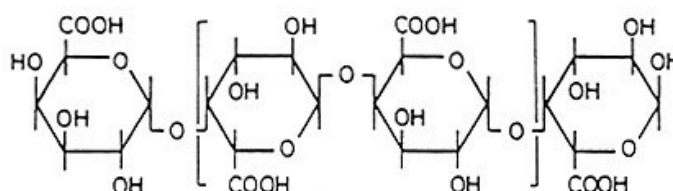


Figura 1 Estrutura química do ácido poligalacturônico
 Fonte: Martínez (2011)

A pectina é um biopolímero de ocorrência natural que vem encontrando aplicações crescentes na indústria farmacêutica (presentes em medicamentos usados no tratamento de doenças gastroenterológicas, diabetes, hipertensão arterial, etc.) e de biotecnologia. Ela vem sendo usada com sucesso por muitos anos nas indústrias alimentícias como agente espessante, gelificante e estabilizador coloidal (SRIAMORNSAK, 2003; PANCHEV et al., 2010). Normalmente, pectinas (como coloides hidrofílicos) agem em meio aquoso (eletroliticamente) e a hidratação das macromoléculas de pectina desempenha um papel-chave no seu uso efetivo em alimentos, bem como em medicamentos (PANCHEV et al., 2010).

A pectina é um polissacarídeo constituinte da parede celular de plantas dicotiledôneas, responsável pela adesão entre as células e pela resistência mecânica da parede celular. A associação de pectina entre celulose e hemicelulose origina a protopectina nos tecidos vegetais. A protopectina, de natureza insolúvel, é facilmente hidrolisada por aquecimento, em meio ácido, formando pectina (MUNHOZ; SANJINEZ-ARGANDO; SOARES, 2008).

Três polissacarídeos pécticos (homogalacturonana – Figura 2 –, ramnogalacturonanas (I e II) – Figuras 3 e 4 – e galacturonanas substituídas) foram isolados de paredes celulares primárias e estruturalmente caracterizados.

Outras galacturonanas substituídas vêm sendo descritas, como a xilogalacturonana e a apiogalacturonana (Figura 5). Homogalacturonana é uma cadeia linear de resíduos de α -1,4 – ácido galactopiranosilurônico, no qual alguns dos grupos carboxílicos são metil esterificados. Dependendo da planta, as homogalacturonanas podem também ser parcialmente acetiladas em C-3 ou C-2. Ramnogalacturonana I (que, ao contrário da homogalacturonana, é altamente ramificada) é uma família de polissacarídeos pécticos que contêm um esqueleto de dissacarídeo de 1,4 – ácido galactopiranosilurônico que se repete. Parte dos resíduos de ramnose na ramnogalacturonana I é substituída com cadeias laterais que consistem principalmente de açúcares neutros, em especial arabinose e galactose. As ramificações podem ser compostas de uma única unidade de açúcar, ou por polímeros complexos, tais como arabinogalactana e arabinana. A quantidade e natureza das cadeias laterais podem se diferenciar consideravelmente. Em geral, a ramnogalacturonana I é um polissacarídeo complexo e instável. Esse pode ser acetilado em C-2 e/ou C-3. Não há evidências químicas conclusivas de que os resíduos de 1,4 – ácido galactopiranosilurônico sejam metil esterificados. Ramnogalacturonana II, ao contrário, possui uma estrutura química altamente estável. Apesar do nome, a estrutura da ramnogalacturonana II difere drasticamente da estrutura da ramnogalacturonana I. O esqueleto da ramnogalacturonana II é composto de aproximadamente nove resíduos de 1,4 – ácido galactopiranosilurônico. Essa cadeia possui quatro cadeias laterais heteropoliméricas de composição conhecida e consistente (FRAEYE et al., 2010).

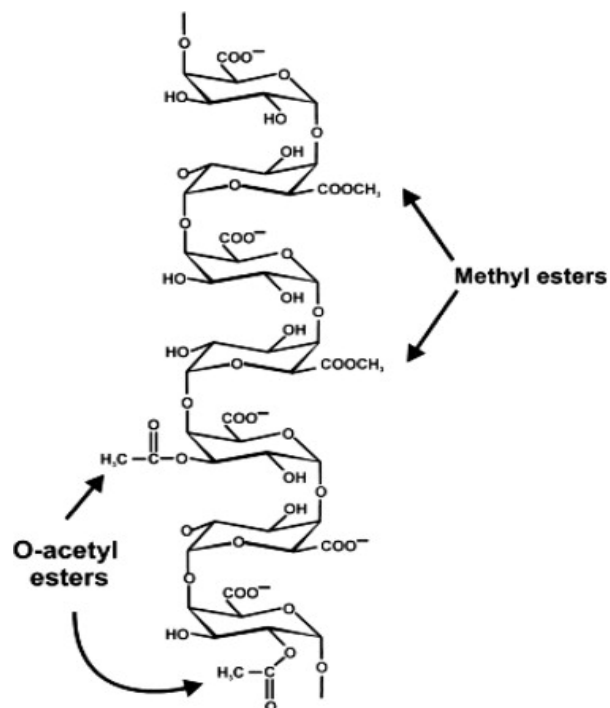


Figura 2 Estrutura da homogalacturonana como um polímero linear de resíduos de ácido galacturônico unidos entre si por ligações α -(1,4)
Fonte: Hosmer e Mohnen (2009)

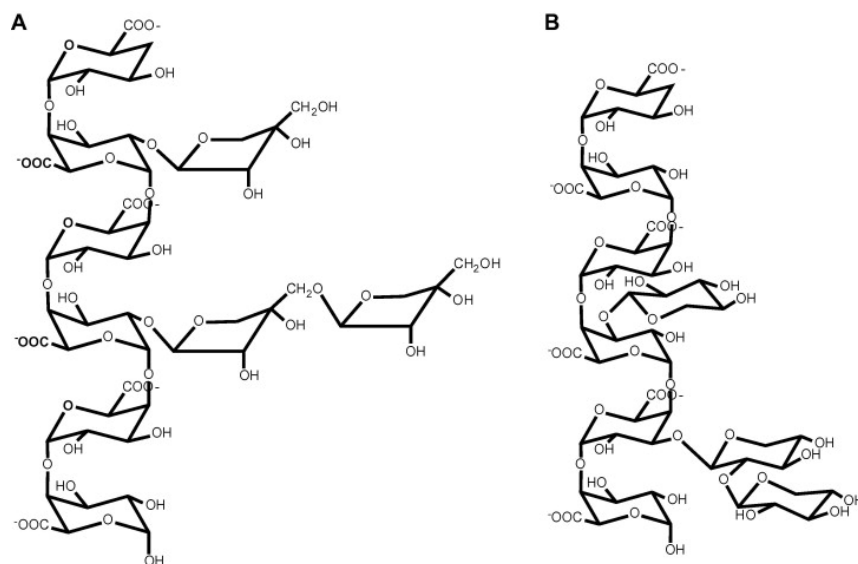


Figura 5 Galacturonanas substituídas: Xilogalacturonanas (B) e apiogalacturonanas (A)

Fonte: Hosmer e Mohnen (2009)

As cadeias laterais contêm onze diferentes monossacarídeos, dentre eles, alguns açúcares incomuns, tais como apiose, ácido acérico e ácido 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosônico (FRAEYE et al., 2010).

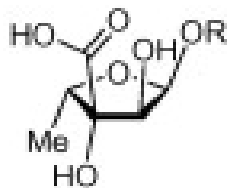


Figura 6 Estrutura do ácido acérico
Fonte: Hosmer e Mohnen (2009)

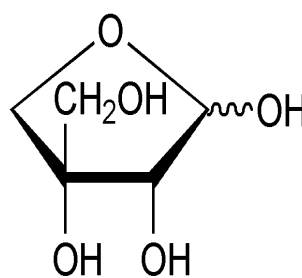


Figura 7 Estrutura da apiose
Fonte: Hosmer e Mohnen (2009)

Apesar de os cientistas geralmente concordarem quanto à composição dos polímeros constituintes da pectina, a organização macromolecular de tais polímeros ainda é objeto de debate. Foi estabelecido que os polímeros constituintes são covalentemente ligados uns aos outros. Até há pouco tempo, era largamente aceita a ideia de que homogalacturonana, ramnogalacturonana I e ramnogalacturonana II formavam um esqueleto contínuo. Entretanto, em 2003, cientistas postularam uma estrutura molecular alternativa, na qual a homogalacturonana é uma cadeia lateral da ramnogalacturonana I, semelhante à arabinana e galactana. Não foi apresentada evidência conclusiva confirmando ou excluindo qualquer uma das estruturas, apesar de que a informação disponível apoia firmemente o primeiro modelo, no qual homogalacturonana, ramnogalacturonana I e ramnogalacturonana II formam o esqueleto (FRAEYE et al., 2010). A pectina é abundantemente usada em vários e diferentes sistemas alimentares. Cada uma dessas aplicações requer uma textura e consistência específica. Esses requerimentos podem ser satisfeitos através de pequenas mudanças nas propriedades do gel por meio do controle da formulação do mesmo e das características estruturais da pectina. Pequenas mudanças nas características químicas da pectina podem ter grande influência nas propriedades do gel. A diversidade química desse polímero deve ser explorada ao máximo. Não apenas a escolha da fonte de pectina, mas também o processo de manufatura determina a estrutura química e, conseqüentemente, a funcionalidade da pectina. O uso de enzimas pécticas permite modificações controladas e direcionadas das características estruturais da pectina, permitindo a produção de pectinas adequadas que sejam especificamente projetadas para um propósito em particular.

O aumento nos teores de pectina solúvel indica amaciamento do fruto e acontece devido ao fato das substâncias pécticas serem degradadas a ácido galacturônico solúvel. O amaciamento da goiaba é um processo que se

caracteriza pela despolimerização das pectinas da parede celular, acompanhado por um aumento na solubilização das mesmas e é controlado por enzimas pectolíticas (LIMA; DURIGAN, 2002; XISTO, 2002).

Reyes, Marin e Bolaños (1976) determinaram o conteúdo pectínico de diversas partes da goiaba em diferentes estádios de maturação. Observaram um conteúdo, na polpa e na cavidade interna, de 0,56 e 1,07 mg.100g⁻¹ no fruto maduro, e de 1,29 e 1,35 mg.100g⁻¹ no verde, respectivamente. Verificaram também que esses conteúdos diminuem com o amadurecimento do fruto. Salunkhe e Desai (1984) relataram que o conteúdo de pectina solúvel aumenta durante o amadurecimento e diminui rapidamente quando o fruto entra na senescência. Rathore (1976) observou que em goiabas o conteúdo de pectina total varia conforme o período de colheita. Vasquez-Ochoa e Colinas-Leon (1990) observaram que a textura diminui em função do amadurecimento.

A firmeza dos frutos verdes e maduros é devido principalmente aos polímeros de pectina, que podem estar metilados e com graus variados de metilação (FERTONANI, 2006; KERTESZ, 1951), podem estar ligados a íons, principalmente Ca⁺⁺, que mantêm cadeias adjacentes unidas entre si, ou ainda podem apresentar suas cadeias glicosídicas interligadas entre si por compostos fenólicos (CHITARRA; CHITARRA, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Segundo Paiva e Lima (2009), a extração da pectina é continuamente estudada ao longo dos anos em consequência de sua importância comercial não somente para a indústria de alimentos e fármacos, mas também em cosméticos, materiais de limpeza e revestimentos biodegradáveis. O processo de extração de pectinas se fundamenta em três etapas básicas: extração ácido-aquosa do material vegetal, precipitação do material extraído e isolamento da pectina.

A condição de extração tem efeitos não apenas na extração propriamente dita, mas também no rendimento e na estrutura química do material extraído. O procedimento de extração da pectina pode ocorrer mediante a ação de ácidos de

origem orgânica e inorgânica, e de álcalis. O processo de extração em meio básico rende pectinas de baixa metoxilação, como resultado da saponificação dos grupos éster, bem como redução no comprimento da cadeia de ácido galacturônico por beta eliminação. Entende-se que ocorre uma despolimerização do ácido pectínico, dificultando a etapa de filtração durante a extração. Entretanto a extração ácida oferece maiores rendimentos (até 20%) em pectina de alta metoxilação, simulando o que ocorre naturalmente nos frutos. Essa situação é preferível e mais usada pelos pesquisadores, pelo fato de não promover mudanças abruptas na fina estrutura do polissacarídeo, permitindo uma caracterização mais confiável, do ponto de vista físico-químico. No processo de extração ácida, o material é tratado com ácido a temperaturas entre 70 e 100°C por tempos suficientes para remover quantidades de pectinas que reproduzam condição de extração exaustiva sem perdas da natureza química da pectina (PAIVA; LIMA, 2009).

De acordo com os mesmos autores, diversas propostas têm sido abordadas visando definir o pH inicial de extração da pectina, a fim de garantir maiores rendimentos. É notadamente reconhecido que a redução do pH inicial de extração permite obter melhores rendimentos, sendo essa a forma mais conveniente para aplicação em escala industrial. Porém, a redução extrema pode ser desfavorável, visto que pode acelerar a degradação do polímero e a desesterificação da pectina. A pectina é facilmente precipitada, mediante a presença de solventes orgânicos ou cossolventes. Os alcoóis usualmente empregados são o etanol e o metanol devido à insolubilidade das substâncias pecticas nos mesmos. Cloreto de alumínio também pode ser utilizado, precipitando as pectinas por *salting out*. A pectina precipitada é prontamente separada da solução por filtração a vácuo, sendo necessárias lavagens sucessivas com acetona ou álcool para retirada das impurezas, tais como pigmentos, sólidos solúveis e outros; presentes no material coextraído com a pectina. Em seguida

utiliza-se uma membrana porosa adequada (material filtrante) que retenha o gel formado. Nesse ponto, a pectina encontra-se isolada, sendo necessária para sua purificação uma etapa adicional de centrifugação e filtração em membranas especiais (MUNHOZ; SANJINEZ-ARGANDO; SOARES, 2008; PAIVA; LIMA, 2009).

Embora as fontes mais usuais para a extração de pectina comercial sejam os albedos cítricos e o bagaço de maçã, as pectinas extraídas apresentam características diferentes (grau de esterificação, tamanho das partículas, conteúdo de açúcares, teor de cinzas e outros) e têm conseqüentemente propriedades funcionais diferentes, o que possibilita o estudo de fontes alternativas de extração. Atualmente, existem inúmeras pesquisas sobre extração de pectina de diferentes fontes, ressaltando-se o aproveitamento de resíduos de indústrias (MUNHOZ; SANJINEZ-ARGANDO; SOARES, 2008).

2.4.2 Celulose

A celulose é o carboidrato mais abundante na natureza, estando presente em quantidades de 20-40% da matéria seca de todas as plantas superiores. É insolúvel em água e constituído por cadeias lineares que contém até cinco mil resíduos de D-glicose unidos por ligações β -(1 \rightarrow 4), que constitui o arcabouço esquelético que dá suporte às outras moléculas da parede celular primária. Pode ser encontrada nas formas amorfa e cristalina, sendo esta última livre de lignina e hemicelulose. Devido à sua linearidade e a sua natureza estereorregular, as moléculas de celulose se associam entre si formando grandes fibras de policristalinos chamadas de microfibrilas, que são unidas através de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Essas microfibrilas estão circundadas por um número menor de cadeias de celulose e por moléculas de hemicelulose. As microfibrilas são compostas por aproximadamente 20 micelas. As micelas

contêm em média 100 cadeias moleculares de celulose. A organização das microfibrilas segue um arranjo pouco ordenado na parede celular primária, sendo frequentemente transversal ao eixo celular e longitudinal aos vértices celulares. Com o envelhecimento celular ocorre a formação das camadas da parede secundária, que confere rigidez a célula, e ainda promove um arranjo definido nas microfibrilas (PAIVA; LIMA, 2009).

2.5 Maturação/amadurecimento

A maturação é um evento no ciclo vital dos frutos por transformá-los em produtos atrativos e aptos para o consumo humano. Corresponde a um processo fisiológico irreversível que estabelece o final do desenvolvimento dos frutos e o início da senescência, podendo ser definida como a sequência de mudanças na cor, sabor, aroma e textura (CHITARRA; CHITARRA, 2005). A mudança quantitativa mais importante durante a maturação de muitos frutos é a hidrólise de polímeros de carboidratos, dos quais a hidrólise de amido e sua conversão em açúcares contribuem para o sabor agradável e a hidrólise de pectinas que é normalmente responsável pelo amaciamento dos frutos (AWAD, 1993).

O índice de maturidade para um produto hortícola é um conjunto de medidas que pode ser usado com a finalidade de definir se um produto em particular encontra-se no estado maturo e implica a definição de pontos mensuráveis durante o desenvolvimento de tal produto que podem adequar-se bem com a maturidade. Os parâmetros frequentemente utilizados como indicadores de maturidade, como tamanho do fruto, acidez titulável, teor de sólidos solúveis, cor da casca, conteúdo de amido e outros açúcares são afetados por diversos fatores. O tamanho do fruto, a acidez titulável e os teores de sólidos solúveis totais dependem da cultivar e variam em relação à cultura, condições ambientais e práticas culturais. O peso, a cor, a firmeza e o teor de cálcio no

fruto variam em relação aos locais de cultivo e às características do solo. Nesse contexto, o uso de um único parâmetro para definir maturidade de um fruto não é recomendado; de fato, mais de um parâmetro deve ser utilizado. Além disso, a escolha de um índice de colheita apropriado reflete os requerimentos de qualidade do produto colhido, necessário para o consumo ou transformação (FADDA; MULAS, 2010).

A qualidade organoléptica é uma complexa peculiaridade na qualidade dos frutos que envolvem aspectos de gosto, textura e aroma. O sabor é percebido por meio de uma combinação de odor, gosto e sensação na boca, e fia-se fortemente no equilíbrio entre açúcares, ácidos orgânicos, compostos voláteis e aminoácidos livres. Modificações em qualquer um desses compostos podem acarretar em modificações na qualidade sensorial como um todo. O amadurecimento dos frutos ativa vias que geralmente influenciam os níveis de pigmentos, açúcares e ácidos, a fim de que a fruta tenha um aspecto mais atraente, ao mesmo tempo em que promove o amolecimento do fruto (OMS-OLIU et al., 2011).

O amadurecimento dos frutos pode ser definido como a sequência de mudanças na cor, sabor e textura, conduzindo a um estado que os torna comestíveis e, com isso, apropriados para o consumo *in natura* e/ou industrialização. Uma das principais mudanças durante esse processo é a produção de etileno. Também pode-se citar mudanças na textura (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

O amadurecimento de frutos envolve mudanças na composição e organização da pectina, hemicelulose e celulose presentes na parede celular, os quais acontecem como uma série coordenada de etapas de desmontagem. Apesar de que o crescimento tenha cessado, a desmontagem seletiva dos componentes da parede celular e a separação célula a célula são muito pronunciadas durante o amadurecimento dos frutos, e imagina-se que sejam a chave para o evento

metabólico, associado ao amadurecimento que determina o ‘*timing*’ e a extensão de perda da adesão celular, o que acarreta o amaciamento do fruto (FADDA; MULAS, 2010).

Apesar de que o amaciamento associado ao amadurecimento de frutos carnosos seja principalmente consequência da degradação da parede celular, mediada por enzimas, um importante papel, que relaciona-se às mudanças ligadas à pressão de turgor, além dos efeitos provenientes das espécies de oxigênio reativas no ‘desmontar’ da parede celular, vem sendo considerado como fator de impacto nesse processo (FIGUEROA et al., 2010). A goiaba é rica em pectina, sendo seu teor influenciado por fatores como cultivar, estágio de maturação, época de desenvolvimento dos frutos e fatores climáticos (MUNHOZ; SANJINEZ-ARGANDO; SOARES, 2008).

2.6 Mudanças no fruto decorrentes do amadurecimento

O etileno é uma das moléculas orgânicas mais simples com atividade biológica. Esse hidrocarboneto gasoso, conhecido como hormônio de amadurecimento das plantas, influencia profundamente o crescimento e desenvolvimento das mesmas. Seus efeitos incluem inibição no crescimento, perda de sensibilidade geotrópica, aceleração da respiração, inibição de enraizamento e modificação de pigmentos de folhas e frutos (BURG; THIMANN, 1959; THEOLOGIS, 1992). Devido ao fato de que grandes perdas de frutas e vegetais são acarretadas pelos efeitos do etileno na senescência de plantas, a significância de meios que controlem o processo de amadurecimento e evitem deterioração é clara (THEOLOGIS, 1992).

Em um determinado estágio de maturação, o etileno, presente nos espaços intercelulares, liga-se ao seu receptor localizado na membrana celular e desencadeia uma série de eventos que culminam com o amadurecimento e

senescência do fruto (LELIÈVRE et al., 1997). Em tecidos vegetais, o etileno é produzido a partir da L-metionina, que é transformada em S-adenosilmetionina, o qual origina o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), por meio da ação da ACC sintase, com recuperação da 5-metiloadenosina. O ACC é transformado em etileno pela ação da ACC oxidase (YANG; HOFFMAN, 1984).

O etileno acelera a degradação da clorofila, o amaciamento dos frutos durante o transporte e o armazenamento, resultando em vida pós-colheita mais curta (KADER, 1994).

Por centenas de anos, os seres humanos usaram várias técnicas para impulsionar a produção de etileno, embora eles não soubessem muito bem como fazê-lo. Os antigos ceifeiros egípcios cortavam os figos coletados para estimular o amadurecimento, e os fazendeiros chineses deixavam peras em quartos fechados com incenso queimando. Mais tarde, pesquisas mostraram que injúrias e altas temperaturas eram o gatilho para a produção de etileno nas plantas. Em 1901, o cientista russo Dimitry Neljubow mostrou que o etileno podia afetar o crescimento das plantas. Três décadas depois, pesquisadores descobriram que as plantas não somente respondiam à presença de etileno, mas elas o produziam por si mesmas (SUNJOO; TAEK, 2007).

A firmeza é um dos atributos de qualidade mais importantes de um fruto, e a mesma está relacionada ao sabor, porque os compostos presentes no fruto que são perceptíveis pelo paladar são também diretamente relacionados com a estrutura do tecido. A textura é uma combinação de sensações derivadas dos lábios, língua, mucosa da boca, dentes, e até mesmo do ouvido. Cada área é sensível a pequenas diferenças de pressão e apresenta respostas diferentes a cada atributo ou característica do fruto. O conjunto das impressões obtidas durante a mastigação é responsável pela aceitação e rejeição do fruto (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

A perda de água decorrente de transpiração afeta adversamente não somente o peso, mas também a aparência, o sabor e a textura dos produtos vegetais. O conteúdo de água intracelular afeta a textura dos frutos ao determinar a pressão de turgor das células. Dessa forma, a diminuição na turgidez pode conduzir à separação celular. Para a maioria dos vegetais, o amaciamento torna-se aparente e o produto é considerado impróprio quando a perda de umidade atinge entre 4 e 8%. (MOLEYAR; NARASIMHAM, 1994).

Vários estudos correlacionando as mudanças na composição (principalmente no que se relaciona à textura) de diferentes frutos durante o período de seu amadurecimento vêm sendo publicados (AABY et al., 2012; CORRÊA et al., 2011; COSTA et al., 2012; ILAHY et al., 2010; LIU; KALLIO; YANG, 2011; NUNES et al., 2009; VALDENEGRO et al., 2012).

Devido à natureza dos polímeros, um grande número de ligações existe dentro da parede celular, mantendo e reforçando sua estrutura; assim sendo, sugere-se que as várias famílias de enzimas e suas diferentes isoformas afetem esses processos (GOULAO; SOUZA; OLIVEIRA, 2007).

Segundo Manica et al. (2000), uma textura firme confere aos frutos maior resistência ao transporte e armazenamento, o que reflete em maior durabilidade na fase pós-colheita e menores perdas. Para a exportação, uma das características imprescindíveis dos frutos é a textura firme. Apesar de ser um parâmetro físico, está estreitamente relacionado com a solubilização de substâncias pécticas. Os frutos com uma elevada porcentagem de pectina solúvel são geralmente de textura fraca, amolecidos e pouco resistentes.

O amolecimento de frutos é um processo multifacetado, resultante de um grande número de mudanças a nível morfológico e celular, principalmente da separação de componentes da parede celular e da redução da pressão de turgor. Durante o crescimento do fruto, as células do mesmo resistem a fortes pressões e requerem manutenção da força da parede celular, além de um

controle do afrouxamento da mesma e uma contínua integração de novos componentes estruturais poliméricos à parede. Durante o amadurecimento, a degradação da arquitetura da parede celular é associada à degradação de seus polissacarídeos e modificação das ligações entre os polímeros. Além disso, a pressão de turgor decresce devido ao acúmulo de solutos na parede celular e contribui para as mudanças texturais (PONCE et al., 2010).

A estrutura da parede celular de frutos ainda não foi completamente elucidada, mas a complexidade de sua deterioração envolve a separação de muitas redes de polissacarídeos durante o amadurecimento. Comparações detalhadas entre diferentes espécies quanto ao metabolismo dos polímeros presentes na parede celular têm favorecido grande parte do conhecimento atual sobre o amolecimento de frutos (PONCE et al., 2010).

2.7 Açúcares ligados à parede celular

Dentre as reações químicas que ocorrem durante a maturação, uma das mais proeminentes é a modificação dos carboidratos, os quais abrangem um dos maiores grupos de compostos orgânicos que desempenham importantes características na estrutura, sabor e valor nutricional dos frutos (LINHARES, 2005). O amadurecimento, em geral, conduz a uma maior doçura, devido ao aumento nos teores de açúcares simples decorrentes de processos biossintéticos ou degradativos dos polissacarídeos presentes no fruto (ABREU, 2010; XISTO, 2002). Entre os polissacarídeos existentes nos frutos, destaca-se o amido, cuja degradação é uma das características mais flagrantes durante o processo de amadurecimento de frutos (ABREU, 2010).

A desidratação dos frutos que resulta em concentração de açúcares e a degradação de polissacarídeos da parede celular também contribuem para o aumento dos açúcares totais (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

De acordo com Manica et al. (2000), os açúcares são compostos naturais, geralmente sólidos, cristalinos e incolores. Os açúcares totais podem representar de 4,71 a 11,36% do peso total da goiaba fresca. Desses, a sacarose, a glicose e a frutose respondem por 74 a 98%, sendo que há ainda outros açúcares, como o inositol, a arabinose e a maltose.

A doçura da goiaba é resultante da proporção entre frutose, glicose e sacarose que, juntamente aos ácidos orgânicos, dá o sabor e o aroma característico do fruto. A elevação nos teores de açúcares é devido à maturação do fruto, que também ocasiona decréscimo na adstringência, pela redução no teor de compostos fenólicos e pelo aumento nas características do aroma devido à emissão de compostos voláteis. Contudo, esse teor mais elevado de açúcares permanece por curtos períodos durante o armazenamento, decrescendo após o armazenamento prolongado. Os teores de açúcares da goiaba podem variar consideravelmente de acordo com a cultivar, condições climáticas e o estágio de maturação da fruta no momento da colheita (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

2.8 Enzimas da parede celular

O amolecimento de um fruto é o principal sinal de seu amadurecimento, e acarreta perda de firmeza e deterioração pós-colheita, facilita infecção por patógenos, reduz a vida de prateleira e a qualidade do fruto. Mudanças na estrutura (que envolvem degradação da lamela média e perda de adesão celular) são as principais causas desse amolecimento. Por tudo isso, o amolecimento dos frutos torna-se um importante parâmetro para determinar a perda de qualidade dos mesmos. Esse processo bioquímico complexo está relacionado com a ação de um número de enzimas que modificam os componentes da parede celular. Durante o amadurecimento, poliuronídeos solúveis em água sofrem um

acrécimo, enquanto que pectinas insolúveis e covalentemente ligadas sofrem um decréscimo. Pectinametilesterase (PME, EC 3.1.1.11) e Poligalacturonase (PG, EC 3.2.1.15) são as duas principais enzimas que agem na fração péctica da parede celular, já que as mesmas estão envolvidas na solubilização das pectinas presentes na parede celular (LIMA, 2003; WEI et al., 2010).

Em goiaba a atividade dessas duas enzimas é bastante contraditória, havendo relatos tanto de aumento da atividade enzimática quanto diminuição. Linhares et al. (2007), avaliando as transformações químicas, físicas e enzimáticas de goiabas “Pedro Sato” tratadas na pós-colheita com cloreto de cálcio e 1-metilciclopropeno armazenadas sob refrigeração, observaram o aumento da atividade de PME com o decorrer do amadurecimento nos frutos-controlados, o mesmo observado por Xisto (2002), avaliando conservação pós-colheita de goiaba Pedro Sato com aplicação de cloreto de cálcio em condições ambientais e por Carvalho (1999) estudando goiabas Kumagai armazenadas sob refrigeração e também Carvalho et al. (2001) que, estudando os componentes da parede celular de goiabas Kumagai, relataram que com a evolução da maturação houve, em geral, aumento na atividade da PME.

Uma característica comum entre frutos durante o amadurecimento é o incremento na atividade enzimática degradativa da parede celular, responsável pelo amaciamento. Diferentes complexos enzimáticos atuam nas paredes celulares dos tecidos vegetais, tanto na fase do desenvolvimento como de amadurecimento, causando modificações nas propriedades texturais. No amadurecimento de frutas, o amaciamento dos tecidos é decorrente da ação de enzimas despolimerizantes, desmetoxilantes e hidrolíticas, como as enzimas pécticas, em conjunto com celulases, hemicelulases, β -galactosidades, entre outras. Dentre essas, salientam-se as enzimas pécticas ou pectinolíticas, as quais catalisam a degradação de macromoléculas de pectinas constituídas por unidades de ácido galacturônico. As substâncias pécticas encontram-se, principalmente,

depositadas na parede celular, atuando como material cimentante, sendo responsáveis pelas mudanças de textura dos frutos (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Um grande número de enzimas tem participação na degradação biológica das substâncias pécnicas, embora algumas ainda não sejam estudadas.

As mudanças aparentes no tamanho molecular dos polímeros da parede celular que acompanham o amadurecimento dos frutos implicam na ação de enzimas capazes de degradar componentes específicos da parede celular. A modificação da estrutura da parede celular, mediada por enzimas durante o amadurecimento de frutos, tem sido estudada em mangas (ALI et al., 1995), abacates (HATFIELD; NEVINS, 1986), cereja (BARRET; GONZALES, 1994) mirtilo ou “*blueberry*” (PROCTOR; MIESLE, 1991), além de outros frutos, como os de clima temperado ou não climatéricos.

Segundo Jain et al. (2001), Oliveira et al. (2006) e Tucker (1993), a perda de firmeza durante o amadurecimento de frutos se deve à atividade de enzimas hidrolíticas que promovem intensa solubilização das pectinas constituintes da parede celular, principalmente a atividade de pectinametilerases e de poligalacturonases. Considerando que a goiaba cv. ‘Pedro Sato’ não apresenta atividade de poligalacturonases (LINHARES et al., 2007), ou é muito baixa e diminui com o amadurecimento (LIMA, 2004; XISTO, 2002) e que a atividade da PME aumenta até o 5º dia depois diminui (ABREU, 2010) e ainda a descoberta de que os polímeros de pectina são transportados para o interior da célula com o decorrer do amadurecimento (ABREU, 2010), a rápida diminuição da firmeza da polpa ainda é inexplicável.

Segundo Jayani, Saxena e Gupta (2005), as enzimas pectinolíticas ou pectinases podem ser divididas em três grandes grupos: protopectinases, depolimerases e esterases. As protopectinases degradam a protopectina insolúvel e produzem pectina solúvel. As depolimerases catalisam a hidrólise da ligação

glicosídica α (1-4) de ácidos D-galacturônicos das substâncias pécticas. As esterases catalisam a desesterificação da pectina pela remoção dos grupos metoxil éster.

No grupo das esterases, encontra-se a pectinametilsterase (PME), que catalisa a hidrólise de ligação C-O nos grupos metoxil éster da pectina, liberando metanol e convertendo pectina em pectato (Figura 8).

As esterases são enzimas capazes de hidrolisar ligações do tipo éster de uma grande variedade de substratos, sendo classificadas em A-esterases, B-esterases e C-esterases. Essa classificação está baseada no tipo de grupamento químico que está covalentemente ligado ao carbono da carbonila do grupo éster que será hidrolisado. As A-esterases são um grupo de esterases que preferem grupos arilas ligados à carbonila dos carboxil-ésteres e que hidrolisam ésteres de organofosfatos. As B-esterases preferem grupamentos alquila ligados a carbonila e são inibidas por ésteres de organofosfatos. Já as C-esterases preferem ésteres de acetato, isto é, um grupo metil ligado ao carbono da carbonila do éster, não sendo capazes de interagir com organofosfatos.

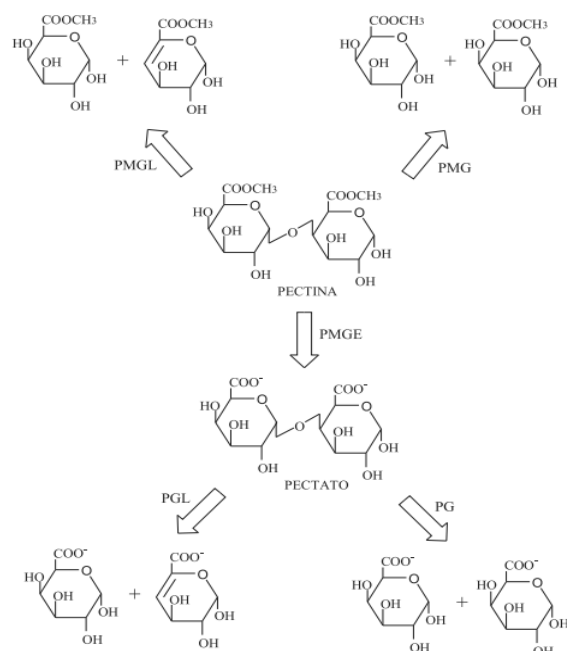


Figura 8 Modo de ação enzimática das pectinases em uma molécula de pectina.
 PMGL: polimetilgalacturonato liase. PMG: Polimetilgalacturonase.
 PMGE: Polimetilgalacturonatoesterase (pectinaesterase). PGL:
 Poligalacturonato liase (pectato liase). PG: Poligalacturonase
 Fonte: Uenojo e Pastores (2007)

2.9 Eletroforese: aspectos gerais

Muitos processos envolvem a separação e purificação de materiais biológicos de outras espécies em solução. Tem-se reconhecido a eletroforese como uma técnica poderosa para realizar tais processos, devido à sua alta seletividade e resolução. Tal técnica baseia-se nas diferentes velocidades de migração de moléculas por meio de um gel em um campo elétrico aplicado e, assim, separam-se componentes de uma mistura, com base no tamanho e na carga. A eletroforese é uma técnica muito apropriada, diferentemente de outros processos tradicionais de separação que envolvem calor ou cisalhamento. Outra

vantagem é a possibilidade de que essa técnica seja economicamente competitiva com técnicas já existentes, que requerem reagentes e meios caros e podem ser ineficientes devido à canalização de líquidos (HO et al., 1999).

A técnica da eletroforese é de valor considerável em inúmeras áreas de pesquisa, já que tal técnica é simples de implementar (aplicação de uma voltagem através de um gel ou capilar) e poderosa na sua habilidade de separar uma mistura de moléculas ou partículas coloidais. Essa separação ocorre devido a diferenças de tamanho, carga, distribuição de carga e/ou forma dos constituintes presentes. Quando uma molécula é colocada em presença de um campo elétrico externo constante, sua mobilidade eletroforética vai depender do equilíbrio de forças elétricas e hidrodinâmicas que agem sobre ela. O problema central da teoria da eletroforese é determinar tais forças por modelos particulares. Essa teoria dificilmente se aplica a uma única partícula, devido ao “efeito eletroforético” (um fluxo hidrodinâmico na partícula produzido pelo movimento de sua atmosfera iônica) e o “efeito de relaxação” (distorção da atmosfera iônica da partícula em equilíbrio devido à presença de um campo elétrico de fluxo externo) (ALLISON et al., 2007).

O fenômeno da eletroforese foi descoberto no início do século XIX, ao observar-se que partículas de argila dispersas em água migravam em presença de um campo elétrico. O campo elétrico impõe uma força Coulombiana, que é equilibrada por fricção hidrodinâmica e faz com que a partícula se mova em uma velocidade finita média. A velocidade média do movimento é proporcional à força do campo elétrico, se o campo não for muito forte (GAŠ, 2009).

Moléculas de menor peso molecular terão mais facilidade de migrar pelo gel do que as de maior peso molecular, e percorrerão uma distância maior, ficando mais próximas do polo positivo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE - UFCSPA, 2010).

2.9.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A poliacrilamida é uma mistura de dois polímeros: acrilamida e bisacrilamida. A acrilamida é uma molécula linear, enquanto que a bisacrilamida é em forma de "T". Misturando essas duas moléculas, tem-se a formação de uma "rede". Diferentes relações entre as concentrações dessas moléculas permitem a criação de diferentes gradientes de separação. Para preparar um gel de poliacrilamida, deve-se misturar as duas substâncias formadoras nas concentrações desejadas, colocá-las em um suporte de vidro, e adicionar Temed e S_2O_8 , que atuam como catalisadores da polimerização (UFCSPA, 2010).

Na eletroforese com gel de poliacrilamida, a separação das moléculas terá sua eficácia determinada tanto pela concentração do polímero, como pela intensidade da voltagem e amperagem aplicadas (UFCSPA, 2010).

Durante as últimas três décadas, a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS emergiu como um método de escolha para as análises de composição polipeptídica de materiais biológicos. A habilidade quase universal do SDS de ligar proteínas com altos rendimentos estequiométricos torna-o capaz de ser utilizado para análise de espécies polipeptídicas em uma amostra biológica, com uma única técnica que oferece alta resolução e reprodutibilidade. Quando associado a métodos sensíveis para visualização de proteínas, tal como coloração com *Coomassie Blue*, o SDS revela o número de espécies polipeptídicas presentes em uma amostra com estimativas de sua abundância relativa e peso molecular aproximado. Tal técnica é relativamente fácil de aprender, rápida e econômica em termos de reagente e amostra (BICSHOFF et al., 1998).

REFERÊNCIAS

- AABY, K. et al. Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening, **Food Chemistry**, London, v. 132, n. 1, p. 86-97, 2012.
- ABREU, J. R. et al. Sugar fractionation and pectin content during the ripening of guava cv. Pedro Sato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 156-162, 2012.
- ABREU, J. R. **Monitoramento de alterações físicas, químicas e fisiológicas durante o amadurecimento de goiabas cv 'Pedro Sato'**. 2010. 94 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- ALLISON, S. A.; PEI, H.; XIN, Y. Review: modeling the free solution and gel electrophoresis of biopolymers: the bead array-effective medium model. **Biopolymers**, New York, v. 87, p. 102–114, 2007.
- ANDRADE, R. D. et al. Caracterización fisicoquímica y reológica de la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) variedades híbrido de Klom Sali, Puerto Rico, D14 y Red. **Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**, Medellín, v. 16, p. 13-18, 2009.
- AWAD, M. **Fisiologia pós-colheita de frutos**. São Paulo: Nobel, 1993. 114 p.
- BAPAT, V. A. et al. Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. **Biotechnology Advances**, New York, v. 28, p. 94-107, 2010.
- BARRET, D. M; GONZALES, C. Activity of softening enzymes during cherry maturation. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, n. 3, p. 574-577, 1994.
- BIRDI, T. et al. Newer insights into the mechanism of action of *Psidium guajava* L. leaves in infectious diarrhoea. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 33, p. 1-11, 2010.
- BISCHOFF, K. M. et al. The detection of enzyme activity following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 260, n. 1, p. 1-17, june 1998.

BULK, R. E.; BABIKER, F. E.; TINAY, A. H. Changes in chemical composition of guava fruits during development and ripening. **Food Chemistry**, London, v. 59, n. 3, p. 395-399, 1997.

BURG, S. P.; THIMANN, K. V. The physiology of ethylene formation in apples. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, Philadelphia, v. 45, p. 335-344, 1959.

CARVALHO, H. A. et al. Eficiência da concentração de cloreto de cálcio e do tempo de imersão no tratamento pós-colheita de goiaba branca cv. Kumagai. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 20, n. 3, p. 375-381, 2001.

CARVALHO, H. A. **Utilização de atmosfera modificada na conservação pós-colheita da goiaba "Kumagai"**. 1999. 115 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manejo. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

COMPANHIA DE ENTREPOSTOS E ARMAZÉNS GERAIS DE SÃO PAULO. **A goiaba em números**. Disponível em: <<http://www.ceagesp.gov.br/produtor/estudos/anexos/goiaba.pdf/view?searchterm=goiaba>>. Acesso em: 21 abr. 2010.

CORRÊA, S. F. et al. Effects of ozone exposure on ‘ Golden ’ papaya fruit by photoacoustic phase-resolved method : physiological changes associated with carbon dioxide and ethylene emission rates during ripening. **Journal of Applied Physics**, New York, v. 109, n. 11, p. 1-7, 2011.

COSTA, F. et al. Postharvest biology and technology texture dynamics during postharvest cold storage ripening in apple (*Malus × domestica* Borkh.). **Postharvest Biology And Technology**, Amsterdam, v. 69, p. 54-63, 2012.

FADDA, A.; MULAS, M. Chemical changes during myrtle (*Myrtus communis* L.) fruit development and ripening. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 125, p. 477-485, 2010.

FERNANDES, F. A.; RODRIGUES, S. Drying of exotic tropical fruits: A comprehensive review. **Food and Bioprocess Technology** v. 4, p. 163- 185, 2011.

- FERNANDES, M. A. F. **Influência da atmosfera modificada e armazenamento no escurecimento de pêssegos cv. Marli**. 2000. 115p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- FERTONANI, H. C. R. **Estabelecimento de um modelo de extração ácida de pectina de bagaço de maçã**. 2006. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.
- FRAEYE, I. et al. Influence of pectin structure on texture of pectin–calcium gels. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 11, p. 401-409, 2010.
- GAŠ, B. Theory of electrophoresis: fate of one equation. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 30, p. 7–15, 2009. Suppl.
- GIANONNI, J. A. **Efeito da radiação gama e do cálcio na conservação pós-colheita da goiaba branca armazenada sob refrigeração**. 2000. 181 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2000.
- GONZAGA NETO, L.; SOARES, J. M. **A cultura da goiaba**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995. 75 p.
- GOULAO, L. F.; SOUSA I. D.; OLIVEIRA C. M. Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 43, p. 307-318, 2007.
- HATFIELD, R.; NEVINS, D. J. Characterization of the hydrolytic activity of avocado cellulase. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 27, p. 541-552, 1986.
- HO, A. K. et al. Measurement and theoretical modeling of protein mobility through membranes. **AIChE Journal**, New York, v. 45, p. 1434–1450, 1999.
- HOSMER, K.; MOHNEN, D. The structure , function , and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 344, p. 1879-1900, 2009.
- ILAHY, R. et al. Antioxidant activity and bioactive compound changes during fruit ripening of high-lycopene tomato cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 24, p. 588-595, 2010.

JAIN, N. et al. Compositional and enzymatic changes in guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v. 23, p. 357-362, 2001.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

KADER, A. A. Ethylene may accelerate deterioration of horticultural perishables. **Perishables Handling Newsletter Issue**, Davies, n. 8, p. 28, Nov. 1994.

KERTESZ, Z. I. The pectic substances. New York: Interscience, 1951.

LELIÈVRE, J. M. et al. Ethylene and fruit ripening. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 101, n. 4, p. 727-739, Dec. 1997.

LIMA, A. V. **Qualidade pós-colheita da goiaba Pedro Sato tratada com cloreto de cálcio e 1-MCP em condições ambiente**. 2004. 67 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

LIMA, M. A. **Conservação pós-colheita de goiaba pelo uso de reguladores de crescimento vegetal, cálcio e da associação destes com refrigeração e embalagens plásticas**. 2003. 114 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2003.

LIMA, M. A.; DURIGAN, J. F. Reguladores vegetais na conservação pós-colheita de goiabas 'Paluma'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, p. 370-375, 2002.

LIMA R. K. et al. Composition of the essential oil from the leaves of tree domestic varieties and one wild variety of the guava plant (*Psidium guajava* L., Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, p. 41-44, 2010.

LINHARES, L. A. et al. Transformações químicas, físicas e enzimáticas de goiabas "Pedro Sato" tratadas na pós-colheita com cloreto de cálcio e 1-metilciclopropeno e armazenadas sob refrigeração. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 829-841, 2007.

LINHARES, L. A. **Transformações químicas, físicas e enzimáticas de goiabas ‘Pedro Sato’ tratadas na pós-colheita com cloreto de cálcio e 1-metilciclopropeno e armazenadas sob refrigeração**. 2005. 135 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

LIU, P.; KALLIO, H.; YANG, B. Phenolic compounds in Hawthorn (*Crataegus grayana*) fruits and leaves and changes during fruit ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 20, p. 11141-11149, 2011.

MANICA, L. et al. **Fruticultura tropical**. Porto Alegre: Cinco continentes, 2000. 373 p.

MARTÍNEZ, N. J. L. et al. Pectina de mango: perspectivas para su extracción. **Revista Ciencia Cierta**, México, v. 7, n. 27, 2011. Disponível em: <<http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC27/7.html>>. Acesso em: 11 jun. 2012.

MENDONÇA, R. D. et al. Características físicas e químicas de goiabas ‘cortibel 1’ e ‘cortibel 4’ armazenadas em condições ambientais. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 685-692, 2007.

MOLEYAR, V.; NARASIMHAM, P. Modified atmosphere packaging of vegetables: na appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 31, n. 4, p. 267-278, 1994.

MOWLAH, G.; ITOO, S. Changes in pectic components, ascorbic acid, pectic enzymes and cellulase activity in ripening and stored guava (*Psidium guajava* L.). **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, Tóquio, v. 30, n. 8, p. 454-461, 1983.

MUNHOZ, C. L.; SANJINEZ-ARGANDO E. J.; SOARES, M. S. Extração de pectina de goiaba desidratada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, p. 119-125, 2008.

NUNES, C. et al. Effects of ripening on microstructure and texture of ‘‘Ameixa d’ Elvas’’ candied plums. **Food Chemistry**, London, v. 115, p. 1094-1101, 2009.

OLIVEIRA, A. C. G. et al. Conservação pós-colheita de goiaba branca Kumagai por irradiação gama: aspectos físicos, químicos e sensoriais. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 375-396, 2006.

OMS-OLIU G. et al. Postharvest biology and technology metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development , ripening , and postharvest shelf-life. **Postharvest Biology And Technology**, Amsterdam, v. 62, p. 7-16, 2011.

ORTIZ, A.; GRAELL, J.; LARA, I. Cell wall-modifying enzymes and firmness loss in ripening ‘Golden Reinders’ apples: A comparison between calcium dips and ULO storage. **Food Chemistry**, London, v. 128, p. 1072-1079, 2011.

OSHIRO, A. M. et al. Caracterização química de goiabas ‘Pedro Sato’ na região de Santa Terezinha, Itaporã, MS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20., 2008, Vitória. **Anais...** Vitória: [s. n.], 2008. 1 CD ROM.

PAIVA, E. P.; LIMA, M. S. Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. **Revista Iberoamericana**, México, v. 10, p. 196-211, 2009.

PAL, D. K.; SELVARAJ, Y. Changes in pectin and pectinesterase activity in developing guava fruits. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 16, n. 3, p. 115-116, May/June 1979.

PANCHEV, I. N. et al. On the water-sorption properties of pectin. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 763-769, Nov./Dec. 2010.

PEREIRA, F. M.; NACHTIGAL, J. C. Melhoramento da goiabeira. In: ROZANE, D. E.; COUTO, F. A. D. A (Ed.). **Cultura da goiabeira: tecnologia e mercado**. Viçosa, MG: UFV, 2003. p. 53-78.

PEREZ, A. A. et al. Biointerfaces surface adsorption behaviour of milk whey protein and pectin mixtures under conditions of air: water interface saturation. **Colloids And Surfaces B**, Amsterdam, v. 85, p. 306-315, 2011.

PINO, J. A.; QUERIS O. Characterization of odor-active compounds in guava wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, p. 4885-4890, 2011.

PINTO, P. M. et al. Estádios de maturação de goiabas ‘Kumagai’ e ‘Pedro Sato’ para o processamento mínimo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, p. 37-43, 2010.

PONCE, N. M. et al. Compositional changes in cell wall polysaccharides from Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) during growth and on-tree ripening, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, p. 2562-2570, 2010.

PROCTOR, A.; MIESLE, T. J. Polygalacturonase and pectimethylesterase activities in developing highbush blueberries. **Horticultural Science**, Alexandria, v. 26, n. 5, p. 579-581, 1991.

RATHORE, D. S. Effect of season on the growth and chemical composition of guava (*Psidium guajava* L.) fruits. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, n. 51, p. 41-47, 1976.

REYES, F. G. R.; MARIN, S. M.; BOLAÑOS, M. A. Determinação de pectina na goiaba. **Revista Brasileira de Tecnologia**, Campinas, v. 7, p. 313-315, 1976.

SALUNKHE, D. H.; DESAI, B. B. **Postharvest biotechnology of fruits**. Florida: CRC, 1984. v. 2.

SHARMA, A. et al. Morphological and chemical characterization of *Psidium* Species. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, Cluj-Napoca, v. 38, n. 1, p. 28-32, 2010.

SINUCCO, D. C. et al. Changes in odour-active compounds of two varieties of Colombian guava (*Psidium guajava* L.) during ripening, **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 230, p. 859-864, 2010.

SRIAMORNSAK, P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review. **Silpakorn University International Journal**, Bangkok, v. 3, p. 206-228, 2003.

SUNJOO, J.; TAEK, K. W. A gaseous plant hormone ethylene: the signaling pathway. **Journal of Plant Biology** Amsterdam, v. 50, n. 2, p. 109-116, Apr. 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

THEOLOGIS, A. One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. **Cell**, Amsterdam, v. 70, p. 181-184, 1992.

TUCKER, G. A. Introduction. In: SEYMOUR, G. B.; TAYLOR, J. E.; TUCKER, G. A. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman & Hall, 1993. cap.1, p. 2-51.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE. **Eletroforese**. Disponível em: <http://genetica.ufcspa.edu.br/biomedic/conteudo/genetica_molecular/eletroforese.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2012.

VALDENEGRO, M. et al. Postharvest biology and technology changes in antioxidant capacity during development and ripening of goldenberry (*Physalis peruviana* L.) fruit and in response to 1-methylcyclopropene treatment. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 67, p. 110-117, 2012.

VASQUEZ-OCHOA, R. I.; COLINAS-LEON, M. T. Changes in guavas of three maturity stages in response to temperature and relative humidity. **HortScience**, México, v. 25, n. 1, p.86-87,1990.

VILA, M. T. R. et al. Caracterização química e bioquímica de goiabas armazenadas sob refrigeração e atmosfera modificada. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1435-1442, set./out. 2007.

WANG, D.; GARTUNG, J. Infrared canopy temperature of early-ripening peach trees under postharvest deficit irrigation. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v. 97, p. 1787-1794, 2010.

WATANABE, T. et al. Avaliação da influência de substâncias fenólicas e carotenoides na anomalia do epicarpo da goiaba, “Anelamento”, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 1, p. 8-13, 2011.

WEI, J. et al. Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit, **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 56, p. 147-154, 2010.

XISTO, A. L. R. P. **Conservação pós-colheita de goiaba “Pedro Sato” com aplicação de cloreto de cálcio em condições ambientais**. 2002. 47 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

XISTO, A. L. R. P. et al. Textura de goiabas ‘Pedro Sato’ submetidas à aplicação de cloreto de cálcio. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 113-118, 2004.

YAMAMOTO, L. Y. et al. Enraizamento de estacas de *Psidium guajava* L. ‘Século XXI’ tratadas com ácido indolbutírico veiculado em talco e álcool, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, p. 1037-1042, 2010.

YANG, S. F.; HOFFMAN, N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v. 35, p. 155-189, 1984.

YAPO, B. M. Pectic substances : from simple pectic polysaccharides to complex pectins: a new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 86, p. 373-385, 2011.

CAPÍTULO 2

Avaliação de métodos de extração de pectina de goiabas cv. 'Pedro Sato'

RESUMO

No Brasil, a cultura da goiaba apresenta grande importância socioeconômica, dadas às suas amplas e variadas formas de utilização. A goiaba é considerada um fruto bastante atrativo, em razão de sua delicada cor e agradável aroma, além de ser uma das mais completas e equilibradas frutas no que diz respeito ao valor nutritivo. Altamente perecível, devido ao seu intenso metabolismo durante o amadurecimento, a goiaba tem vida útil que pode chegar de 3 até 5 dias sob temperatura ambiente. A firmeza dos frutos verdes e maduros são principalmente devido aos polímeros de pectina. A perda de firmeza durante o amadurecimento de goiaba é devido à atividade de enzimas hidrolíticas que promovem intensa solubilização das pectinas constituintes de parede celular. Embora a goiaba seja considerada uma fruta rica em pectina, os teores relatados na literatura não ultrapassam 2,4%. Com esse baixo teor, as pectinas não podem ser os únicos compostos responsáveis pela firmeza da goiaba. Diante do exposto, o objetivo neste trabalho foi extrair pectina da polpa de goiaba durante o amadurecimento através de dois processos (extração com etanol 95% e com EDTA) e sugerir modificações para justificar a presença de maiores teores de pectina na polpa da goiaba, e comprovar sua principal responsabilidade pela manutenção da firmeza do fruto. Foram colhidas goiabas no estágio “de vez” e armazenadas por 8 dias à temperatura de $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $78\% \pm 1\%$. A extração se mostrou mais eficiente com o uso de EDTA, onde o teor médio de pectina total detectado foi de 9,10%. A partir da execução de uma nova etapa de extração no método com etanol, o teor médio de pectina total foi de 7,63%. Os teores estimados foram maiores do que os citados na literatura, o que pode indicar uma maior participação da pectina na firmeza do fruto.

Palavras-chave: Amadurecimento. Pectina total. Métodos de extração.

ABSTRACT

In Brazil, the guava culture has a great socioeconomic importance, given its wide and varied forms of use. It is considered a very attractive fruit, due to its delicate color and pleasant aroma, and it is one of the most complete fruits in what concerns its nutritional value. Highly perishable, because of its intense metabolism during ripening, the fruit has a shelf life that can reach 3 to 5 days under room temperature. The firmness of the green and ripe fruits is owing mainly to the pectin polymers. The loss of firmness during the guava ripening is a result of the activity of hydrolytic enzymes that promote intense solubilization of pectin constituents of the cell wall. Although guava is considered to be rich in pectin, the amounts reported in the literature do not exceed 2.4%, and such content does not explain the responsibility for the firmness of guava. Based on the considerations above, the aim of this study was to extract pectin from the guava pulp during its ripening through the use of two methods (extraction with ethanol and with EDTA), suggest modifications to justify the presence of higher pectin contents, and prove its main responsibility for maintaining the fruit firmness. The fruits were harvested in an incomplete ripening stage and stored for 8 days at the temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ and relative humidity of $78\% \pm 1\%$. The extraction was more effective when EDTA was used, and the total pectin content was 9.10%. From the implementation of a new stage in the method of extraction with ethanol, the average content of total pectin was 7.63%. The estimated contents were higher than the ones cited in the literature, which can better explain the role of pectins in the fruit firmness.

Keywords: Ripening. Total pectin. Extraction methods.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com uma grande área territorial. Entretanto, somente 5% dessa área são usados para a fruticultura. Mesmo assim, a fruticultura é uma atividade de extrema importância para o Brasil, devido a vários fatores: geração de emprego, melhor distribuição da renda regional, geração de produtos de valor comercial, expectativas de mercado interno e externo. Uma das alternativas que vem se destacando é a cultura da goiaba, já que a mesma é altamente rentável e as possibilidades de sua expansão no país são grandes (SOUZA; MANCIN; MELO, 2003).

O fruto da goiabeira é uma das principais matérias-primas utilizadas pela indústria brasileira de conservas, o que permite várias formas de aproveitamento como, por exemplo, purê, polpa, néctar, suco, compota, sorvete, doce, etc. (SILVA et al., 2007).

A goiabeira é uma das fruteiras de clima tropical que tem apresentado maior incremento das áreas de plantio, sendo a maior parcela dos frutos produzidos destinada à industrialização, porém tem havido significativo crescimento do mercado de frutas *in natura*, principalmente nos grandes centros urbanos (PEREIRA; NACHTIGAL, 2003). A goiaba 'Pedro Sato' tem grande destaque no Brasil devido à grande produção.

Altamente perecível, devido ao seu intenso metabolismo durante o amadurecimento, a goiaba tem vida útil que pode chegar de 3 até 5 dias sob temperatura ambiente (CARVALHO, 1994; DURIGAN, 1997; GONATTI NETTO et al., 1996), em que a diminuição da firmeza é a característica mais marcante nesse processo de amadurecimento.

O amolecimento (relacionado ao amadurecimento) dos frutos é geralmente associado à desestruturação da lamela média e da parede celular primária, que é composta por rígidas microfibrilas de celulose mantidas juntas

por meio de redes de hemicelulose e pectinas. As pectinas são um grupo de polissacarídeos naturais de superfície; são componentes estruturais de paredes celulares primárias de frutos e vegetais, usadas na indústria alimentícia como estabilizantes, espessantes e agentes gelificantes (PEREZ et al., 2011).

Há vários estudos relacionados à mudança nos teores de pectina em frutos de goiaba durante o seu amadurecimento; esses estudos têm mostrado que o teor de pectina total está próximo de 2,4% (BULK; BABIKER; TINAY, 1997; CARVALHO, 1999; CARVALHO et al., 2001; GIANONNI, 2000; LIMA, 2004; LINHARES et al., 2007; MENDONÇA et al., 2007; MOWLAH; ITOO, 1983; OSHIRO et al., 2008; PAL; SELVARAJ, 1979; VILA et al., 2007; XISTO et al., 2004) no entanto, essas quantidades de pectina não parecem condizentes com a responsabilidade principal desse tipo de molécula em manter a firmeza dos frutos (ABREU et al., 2012).

Assim sendo, o objetivo neste trabalho foi extrair pectina da polpa de goiaba durante o amadurecimento através de dois processos e sugerir modificações no processo de extração, visando obter quantidades maiores de pectina na polpa de goiaba, e com isso sugerir uma maior participação dessas moléculas na manutenção da firmeza do fruto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Procedência e colheita dos frutos

As goiabas (*Psidium guajava* L.) da cv. “Pedro Sato” foram colhidas em um pomar comercial situado no município de Lavras, Minas Gerais, altitude 845 m, latitude 21,15° Sul, longitude 45,22° Oeste.

Foram colhidas manualmente no início da manhã, no estágio de amadurecimento “de vez” (coloração verde claro), acondicionadas em caixas de isopor e transportadas ao Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, para realização das análises.

2.2 Preparo dos frutos

Para realização dos testes, os frutos colhidos foram selecionados em função do tamanho, cor, ausência de injúrias mecânicas e fisiológicas, lavados em água corrente e separados em 8 grupos de 9 frutos para composição dos tratamentos. Todos os frutos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 1% a 20°C por 5 minutos para desinfecção. Os mesmos foram numerados, armazenados em uma estante no laboratório e mantidos por um período de 7 dias a uma temperatura e umidade relativa média de respectivamente 22°C ± 1°C e 78% ± 1%.

2.3 Preparo da amostra

As amostras foram preparadas no dia da colheita e a cada dia até o fim do período de amadurecimento; os frutos foram picados em pedaços de

aproximadamente 1cm³ e o endocarpo removido. Em seguida, os frutos foram acondicionados em sacos plásticos separadamente, em três grupos de três frutos cada um e foram colocados no *freezer* para a posterior realização das análises.

2.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com 8 tratamentos (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias de amadurecimento) com 3 repetições (fruto) por tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANAVA), por meio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2005). As médias dos tratamentos foram comparadas por meio de regressão.

2.5 Análises

2.5.1 Perda de massa

Foi determinada a partir da diferença entre a massa inicial dos frutos e a massa que os mesmos apresentaram a cada dia de armazenamento.

2.5.2 Pectinas

Foram analisadas as frações solúvel, insolúvel e resíduo (fração resultante após a determinação da pectina insolúvel) por meio de dois métodos de extração, sendo o primeiro a partir do uso de etanol 95% (MCCREADY; MCCOOMB, 1952), e o segundo a partir de solução de EDTA tetrassódico 2,0mM em pH 7,0 (ABREU, 2010). As mesmas foram quantificadas colorimetricamente por meio de reação com carbazol, segundo a técnica de

Bitter e Muir (1962). Os teores foram expressos em g de ácido galacturônico em 100g de polpa.

2.5.2.1 Extração de pectinas com etanol 95% (MCCREADY; MCCOOMB, 1952)

2.5.2.1.1 Pectina insolúvel

Pesou-se 1,0g de amostra (1,0 g de goiaba pura foi macerada previamente, sem adição de solventes, com auxílio de almofariz e pistilo) e adicionou-se 10,0mL de álcool etílico 95%. Após repouso de uma noite, as amostras foram submetidas à agitação (agitador mecânico a 60 rpm e 25°C) por 1 hora. Após a agitação, filtrou-se com papel de filtro, e lavou-se o mesmo com 2 porções de 4,0mL de álcool etílico 95%. Armazenou-se o filtrado. Ao resíduo do papel de filtro, adicionou-se 10,0mL de solução de EDTA 11,06 mM, pH 11,0. Após 30 minutos o pH foi ajustado para 5,0 com ácido acético 10% e foram adicionados 50mg de pectinase (Sigma Aldrich; 1,02U.mg⁻¹) à amostra e, após uma hora de agitação (agitador mecânico a 60 rpm e 25°C), procedeu-se a filtração e completou-se o volume do sobrenadante para 20,0mL com solução de EDTA. Obteve-se assim a pectina total que após quantificada, teve seu valor subtraído em relação à pectina solúvel, obtendo-se assim o teor de pectina insolúvel.

2.5.2.1.2 Pectina solúvel

Foram realizados os mesmos procedimentos executados no item supracitado. Porém, ao resíduo do papel de filtro, adicionou-se 10,0mL de água

destilada e, após uma hora de agitação, procedeu-se a filtração e armazenou-se o sobrenadante.

2.5.2.2 Extração de pectinas com solução de EDTA tetrassódico 2,0mM em pH 7,0 (ABREU, 2010)

Pesou-se 0,25g de amostra (0,25 g de goiaba pura foi macerada previamente, sem adição de solventes, com auxílio de almofariz e pistilo) e adicionou-se 10,0mL de solução de EDTA 2,0mM em pH 7,0. A amostra foi então colocada em ebulição por 5 minutos e centrifugada a 5.000g e 25°C durante 5 minutos. O sobrenadante foi denominado SOB 01 e o sedimento, SED 01.

Ao sobrenadante (SOB 01), adicionou-se 40,0mL de etanol absoluto gelado e, após uma hora em *freezer*, a amostra foi centrifugada a 5.000g e 4°C durante 5 minutos. Ao sedimento, foram adicionados 2,5mL de água destilada, e obteve-se, por conseguinte, a pectina solúvel.

Ao sedimento (SED 01), adicionou-se 20,0mL de solução de EDTA 2,0mM em pH 7,0. Posteriormente, ajustou-se o pH para 5,0 com ácido acético 10%. Foram adicionados 50mg de pectinase (Sigma Aldrich; 1,02U.mg⁻¹) e, após 1 hora de agitação (agitador mecânico a 60 rpm e 25°C), a amostra foi centrifugada a 5.000g e 25°C durante 5 minutos. O sobrenadante (pectina insolúvel) foi armazenado e ao sedimento (SED 02) foram adicionados 5,0mL de solução de EDTA 2,0mM em pH 7,0 e ajustou-se o pH para 5,0 com ácido acético 10%. Após adição de 50mg de celulase (Sigma Aldrich; 0,8U.mg⁻¹), a amostra foi colocada em banho-maria a 30°C por uma noite. No outro dia, a amostra foi centrifugada a 5.000g e 25°C durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado. Ao sedimento, adicionou-se 5,0mL de solução de EDTA 2,0mM em pH 7,0 e ajustou-se o pH para 5,0 com ácido acético 10%. Após adição de 50mg

de pectinase, a amostra foi submetida à agitação durante 1 hora e, posteriormente, centrifugada a 5.000g e 25°C durante 5 minutos. O sobrenadante foi armazenado e denominado resíduo de pectina (RP), e o sedimento foi descartado.

2.5.3 Determinação de açúcares

Os açúcares presentes em cada fração foram determinados pelo método de Antrona (DISCHE, 1962). Os resultados foram expressos em porcentagem ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ polpa fresca).

2.5.4 Interferência de açúcares na análise de pectinas

Com a finalidade de avaliar a interferência de açúcares na análise de pectinas com carbazol (BITTER; MUIR, 1962) e também a influência da pectina na análise de açúcares com antrona (DISCHE, 1962), foram construídas várias curvas-padrão de pectina na presença de várias concentrações de glicose para cada concentração de pectina. As concentrações de pectina utilizadas foram 0, 10, 20, 30, 40, 45 μg e as de glicose foram 0, 5, 10, 15, 20, 25 μg .

Gráficos do tipo superfície de resposta foram construídos para cada análise.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perda de massa dos frutos

A perda de massa fresca ao fim do período de armazenamento foi de 15,4% (Gráfico 1). Segundo Chitarra e Chitarra (2005), uma perda de massa de até 15% não prejudica a aparência. A perda de massa fresca dos frutos é uma variável importante que está diretamente relacionada com a qualidade do fruto. Um dos principais problemas durante o armazenamento de frutas e hortaliças é a perda de massa por causa do processo de transpiração. A perda de água leva ao amolecimento dos tecidos, tornando os frutos mais suscetíveis às deteriorações e a alterações na cor e sabor (AZZOLINI; JACOMINO; SPOTTO, 2004). Os valores aceitáveis de perda de massa fresca para diferentes cultivares encontram-se entre 10,0 e 15,0% (XISTO, 2002); sendo assim, pode-se afirmar que os resultados deste estudo estão dentro da faixa, com uma pequena variação.

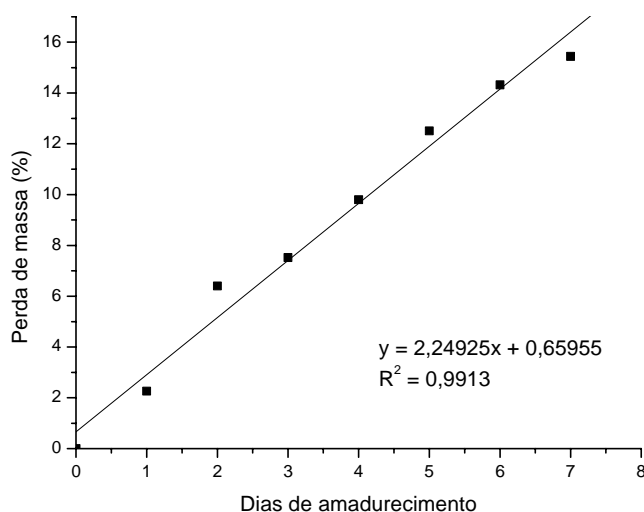


Gráfico 1 Porcentagem de perda de massa de goiabas 'Pedro Sato' armazenadas em condições ambiente

A perda de massa em goiabas armazenadas à temperatura ambiente varia de acordo com as condições experimentais utilizadas por cada pesquisador. Carvalho (1999) verificou uma perda de 10,69% de massa fresca para goiabas 'Kumagai' após 8 dias de armazenamento. Xisto (2002) observou uma perda de massa igual a 13,80% ao final do período de armazenamento de goiabas 'Pedro Sato'. Linhares (2005), ao analisar a perda de massa da mesma cultivar, verificou, ao sexto dia de armazenamento, uma perda de 11,39% de massa. Detectou-se, para esse experimento, 14,31% de perda de massa no referido dia.

Apesar da porcentagem de perda de massa verificada estar dentro da faixa aceitável para o consumo, ao final dos 8 dias de armazenamento os frutos apresentavam coloração amarelada e uma menor textura crocante, além de estarem amolecidos, tornando-se impraticável o uso dos mesmos para o comércio da fruta fresca.

3.2 Teores de pectina

As análises de extração de pectina utilizando o método proposto por McCready e McCoomb (1952) e o método descrito em Abreu (2010) durante o amadurecimento de goiaba cv. 'Pedro Sato' foram realizadas. Os resultados encontram-se na Tabela 1.

Os polímeros de pectina são considerados os principais responsáveis pela firmeza dos frutos verdes (ABREU, 2010; FERTONANI, 2006; KERTESZ, 1951) e a sua degradação por enzimas como a PME e a PG durante o amadurecimento provoca o amaciamento e a perda de firmeza do fruto. Em goiabas isso não é diferente; entretanto, a quantidade de pectinas encontrada na polpa da goiaba (ao redor de 2,5% em peso verde e 15% em peso seco) é uma quantidade muito pequena para ser considerada a principal responsável pela manutenção da firmeza.

Outro fator a ser considerado também é a grande variação na quantidade de pectina durante o amadurecimento. A afirmação que “a quantidade de pectina total pode aumentar, diminuir ou permanecer constante” (BULK; BABIKER; TINAY, 1997; CARVALHO, 1999; CARVALHO et al., 2001; GIANONNI, 2000; LIMA, 2004; LINHARES et al., 2007; MENDONÇA et al., 2007; MOWLAH; ITOO, 1983; OSHIR et al., 2008; PAL; SELVARAJ, 1979; VILA et al., 2007; XISTO, 2002; XISTO et al., 2004) reflete bem a incerteza dos resultados em torno dessa substância (ABREU, 2010).

Abreu et al. (2012), através de análises de fracionamento de açúcares e composição centesimal de goiabas 'Pedro Sato', sugeriram que a quantidade de pectina em goiabas deve ser maior que os 2,5% em peso verde (ou 15% em peso seco) descritos na literatura.

Tabela 1 Teores médios (em porcentagem) das frações de pectina solúvel (PS) e insolúvel (PI) de acordo com dois métodos distintos de extração durante o amadurecimento de goiabas cv. 'Pedro Sato'

Dia	0	1	2	3	4	5	6	7
PS*	0,10aA	0,13bA	0,16cA	0,24dA	0,29eA	0,35fA	0,39gA	0,42hA
PS**	0,23aB	0,34bB	0,40cB	0,46dB	0,56eB	0,62fB	0,68gB	0,76hB
PI*	2,25aC	2,20aC	2,13bC	2,09bC	2,06cC	1,98dC	2,00dC	1,93eC
PI**	3,50aD	3,42aD	3,39aD	3,27bD	3,20bD	3,19bD	3,09cD	3,03cD

Médias seguidas de mesma letra e coluna nas linhas não diferem entre si pelo teste de Skott Knott a 5% de probabilidade

*Extração com etanol 95%

**Extração com solução de EDTA tetrassódico 2,0 mM em pH 7,0

Os resultados encontrados para a pectina solúvel e insolúvel utilizando a metodologia de McCready e McCoomb (1952) estão de acordo com os resultados encontrados na literatura: a pectina solúvel aumenta e a pectina insolúvel diminui com o amadurecimento. A soma dessas duas frações (PS e PI), aproximadamente 2,35%, está de acordo com a literatura.

Quando o método de extração descrito em Abreu (2010) foi utilizado, observou-se um aumento na quantidade de pectina solúvel e de pectina insolúvel; porém, um comportamento semelhante ao método anterior, ou seja, a pectina solúvel aumenta e a pectina insolúvel diminui de maneira equivalente durante o amadurecimento.

Diante da repetição dos resultados encontrados na literatura foi proposta uma nova etapa na extração da pectina, nos dois métodos testados, ou seja, o tratamento do resíduo após a determinação da pectina insolúvel, com celulase e pectinase, com a finalidade de degradar a estrutura da parede celular do fruto e

liberar outras moléculas de pectinas, que serão hidrolisadas pela pectinase, denominadas aqui de resíduo de pectina (RP). Os resultados estão representados na Tabela 2, e demonstraram que uma grande quantidade de pectina fica presa na parede celular do fruto para os dois métodos testados, uma vez que as quantidades de pectina dessa última fração (RP) foram iguais para os mesmos. Não houve diferença significativa durante os dias de armazenamento e também entre os dois métodos.

Tabela 2 Teores médios (em porcentagem) da fração resíduo de pectina (RP) de acordo com dois métodos distintos de extração durante o amadurecimento de goiabas cv. 'Pedro Sato'

Dia	0	1	2	3	4	5	6	7
RP*	5,38aA	5,43aA	5,39aA	5,42aA	5,44aA	5,43aA	5,44aA	5,39aA
RP**	5,40aA	5,40aA	5,37aA	5,32aA	5,39aA	5,46aA	5,41aA	5,44aA

Médias seguidas de mesma letra nas linhas e colunas não diferem entre si pelo teste de Skott Knott a 5% de probabilidade

*Extração com etanol 95%

**Extração com solução de EDTA tetrassódico 2,0 mM em pH 7,0

Sendo as quantidades de pectina nas frações “resíduo de pectina” iguais, pode-se concluir que nos dois métodos foi extraída toda pectina solúvel e toda pectina insolúvel. Se essa hipótese é verdadeira, deveria se esperar que as quantidades de pectina solúvel e insolúvel fossem também iguais nos dois métodos. Como o segundo método apresenta maior quantidade de PS e de PI, pode-se sugerir também aqui a interferência de açúcares na análise da pectina com carbazol (ABREU, 2010), ou seja, o método de extração descrito em Abreu (2010) deve resultar em amostras mais contaminadas com açúcares solúveis, e o resíduo de pectina deve apresentar valores semelhantes de açúcares.

A soma dos valores das pectinas solúvel, insolúvel e resíduo de pectina foi denominada pectina total e os valores encontrados pelo primeiro método de extração (MCCREADY; MCCOOMB, 1952) foram semelhantes aos propostos por Abreu et al. (2012), baseados em fracionamento de açúcares e composição centesimal. Já os valores da pectina total para o segundo método de extração foram superiores em função de maiores valores de pectina solúvel e insolúvel (Tabela 3).

Tabela 3 Teores médios (em porcentagem) da fração pectina total (PT) de acordo com dois métodos distintos de extração durante o amadurecimento de goiabas cv. 'Pedro Sato'

Dia	0	1	2	3	4	5	6	7
PT*	7,73aA	7,75aA	7,69aA	7,76aA	7,79aA	7,76aA	7,83aA	7,73aA
PT**	9,13aB	9,17aB	9,16aB	9,05aB	9,16aB	9,27aB	9,18aB	9,24aB

Médias seguidas de mesma letra nas linhas e colunas não diferem entre si pelo teste de Skott Knott a 5% de probabilidade

*Extração com etanol 95%

**Extração com solução de EDTA tetrassódico 2,0 mM em pH 7,0

A análise de açúcares totais nas frações PS, PI e RP foi então realizada (Tabela 4), e os resultados mostraram maiores valores de açúcares nas frações PS e PI para o método descrito por Abreu (2010) e valores iguais de RP para os dois métodos.

Tabela 4 Açúcares totais (mg/100g) nas frações de pectina pelos métodos de Abreu (2010) e McCready e McCoomb (1952)

Dia	0	1	2	3	4	5	6	7
PS*	0,26aA	0,09aA	0,13aA	0,12aA	0,34aA	0,19aA	0,10aA	0,50aA
PS**	0,35aB	0,70aB	0,34aB	0,25aB	1,44aB	1,48aB	1,60aB	1,17aB
PI*	4,41aC	3,84aC	4,50aC	4,36aC	3,54aC	4,11aC	4,30aC	4,74aC
PI**	12,40aD	10,19aD	12,90aD	10,08aD	10,06aD	13,13aD	10,45aD	11,85aD
RP*	17,97aE	15,65aE	15,55aE	15,86aE	16,49aE	16,50aE	16,96aE	16,19aE
RP**	17,77aE	16,19aE	16,86aE	16,53aE	16,25aE	18,47aE	16,94aE	17,00aE

Médias seguidas de mesma letra nas linhas e colunas não diferem entre si pelo teste de Skott Knott a 5% de probabilidade

*Extração com etanol 95%

**Extração com solução de EDTA tetrassódico 2,0 mM em pH 7,0

A fim de avaliar a interferência dos açúcares na análise de pectina, foram construídos gráficos do tipo superfície de resposta com várias concentrações de ácido galacturônico e várias concentrações de glicose, e a análise de pectina foi realizada com carbazol e com antrona (Gráfico 2). Os resultados mostraram que não há interferência da pectina na análise de açúcares (Gráfico 2A), mas há grande interferência do açúcar na análise de pectina (Gráfico 2B).

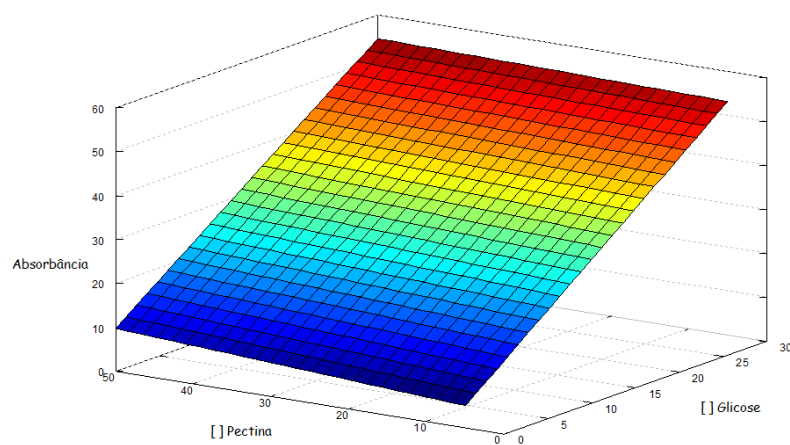


Gráfico 2A Superfície de resposta para análise da interferência do teor de pectina sobre o teor de açúcar

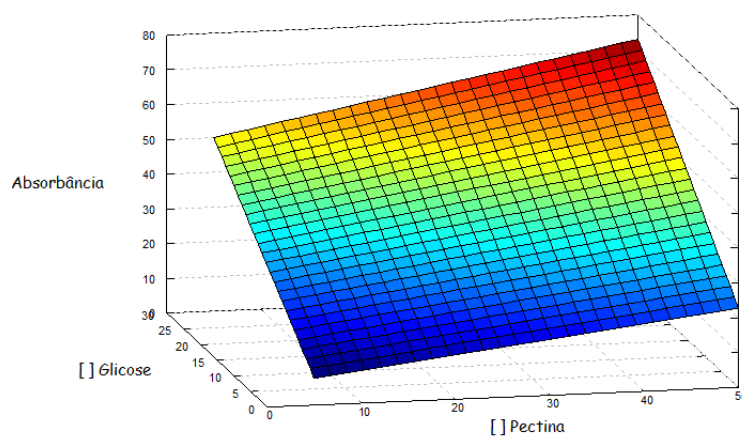


Gráfico 2B Superfície de resposta para análise da interferência do teor de açúcar sobre o teor de pectina

4 CONCLUSÃO

- a) a partir da comparação entre os dois métodos, foi possível perceber que há diferença nos teores de pectina, devido à contaminação por açúcar;
- b) a nova etapa no processo de extração proporcionou uma incrementação no teor de pectina.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. R. et al . Sugar fractionation and pectin content during the ripening of guava cv. Pedro Sato. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 1, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612012005000029>. Acesso em: 22 dez. 2011.
- ABREU, J. R. **Monitoramento de alterações físicas, químicas e fisiológicas durante o amadurecimento de goiabas cv 'Pedro Sato'**. 2010. 94 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- AZZOLINI, M.; JACOMINO, A. P.; SPOTTO, M. H. F. Estádios de maturação e qualidade pós-colheita de goiabas 'Pedro Sato'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 29-31, 2004.
- BITTER, T.; MUIR, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 34, n. 2, p. 330-334, Apr. 1962.
- BULK, R. E.; BABIKER, F. E.; TINAY, A. H. Changes in chemical composition of guava fruits during development and ripening. **Food Chemistry**, London, v. 59, n. 3, p. 395-399, 1997.
- CARVALHO, H. A. et al. Eficiência da concentração de cloreto de cálcio e do tempo de imersão no tratamento pós-colheita de goiaba branca cv. Kumagai. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 20, n. 3, p. 375-381, 2001.
- CARVALHO, H. A. **Utilização de atmosfera modificada na conservação pós-colheita da goiaba "Kumagai"**. 1999. 115 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- CARVALHO, V. D. Qualidade e conservação pós-colheita de goiabas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.17, n. 179, p. 48-54, 1994.
- DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. (Ed.). **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic, 1962. p. 477-512.
- DURIGAN, J. F. Colheita, conservação e embalagens. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA GOIABEIRA, 1., 1997, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1997. p.149-158.

FERREIRA, D. F. **Sisvar**: versão 4.6 (build 61) software. Lavras: Dex/UFLA, 2003. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff//softwares.htm>>. Acesso em: 22 maio 2012.

FERTONANI, H. C. R. **Estabelecimento de um modelo de extração ácida de pectina de bagaço de maçã**. 2006. 82 p. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

GIANONNI, J. A. **Efeito da radiação gama e do cálcio na conservação pós-colheita da goiaba branca armazenada sob refrigeração**. 2000. 181 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2000.

GONATTI NETTO, A. et al. **Goiaba para exportação**: procedimentos de colheita e pós-colheita. Brasília: EMBRAPA, 1996. 35 p. (Frupep, 20).

KERTESZ, Z. I. **The pectic substances**. New York: Interscience, 1951.

LIMA, A. V. **Qualidade pós-colheita da goiaba Pedro Sato tratada com cloreto de cálcio e 1-MCP em condições ambiente**. 2004. 67 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

LINHARES, L. A. et al. Transformações químicas, físicas e enzimáticas de goiabas “Pedro Sato” tratadas na pós-colheita com cloreto de cálcio e 1-metilciclopropeno e armazenadas sob refrigeração. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 829-841, 2007.

LINHARES, L. A. **Tranformações químicas, físicas e enzimáticas de goiabas ‘Pedro Sato’ tratadas na pós-colheita com cloreto de cálcio e 1-metilciclopropeno e armazenadas sob refrigeração**. 2005. 135 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

McCREADY, R. M.; McCOOMB, E. A. Extraction and determination of total pectic materials in fruits. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 42, n. 12, p. 1586-1588, Dec. 1952.

MENDONÇA, R. D. et al. Características físicas e químicas de goiabas ‘cortibel 1’ e ‘cortibel 4’ armazenadas em condições ambientais. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 685-692, 2007.

MOWLAH, G.; ITOO, S. Changes in pectic components, ascorbic acid, pectic enzymes and cellulase activity in ripening and stored guava (*Psidium guajava* L.). **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, Tóquio, v. 30, n. 8, p. 454-461, 1983.

OSHIRO, A. M. et al. Caracterização química de goiabas 'Pedro Sato' na região de Santa Terezinha, Itaporã, MS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20., 2008, Vitória. **Anais...** Vitória: [s. n.], 2008. 1 CD ROM.

PAL, D. K.; SELVARAJ, Y. Changes in pectin and pectinesterase activity in developing guava fruits. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 16, n. 3, p. 115-116, May/June 1979.

PEREIRA, F. M.; NACHTIGAL, J. C. Melhoramento da goiabeira. In: ROZANE, D. E.; COUTO, F. A. D. A (Ed.). **Cultura da goiabeira: tecnologia e mercado**. Viçosa, MG: UFV, 2003. p. 53-78.

PEREZ A. A. et al. Biointerfaces surface adsorption behaviour of milk whey protein and pectin mixtures under conditions of air: water interface saturation. **Colloids and Surfaces B**, Amsterdam, v. 85, p. 306-315, 2011.

SILVA, E. F. S. et al. Caracterização de germoplasma de goiabeira e araçazeiro em diferentes ecorregiões do Brasil. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMI-ÁRIDO, 2., 2007, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007. (Documentos, 205). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/CPATSA/36756/1/OPB1581.pdf>>. Acesso em: 16 abr. 2010.

SOUZA, O. P.; MANCIN, C. A.; MELO, B. **Cultura da goiabeira**. Uberlândia: UFU, 2003. Disponível em: <<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/goiabao.html>>. Acesso em: 10 maio 2012.

VILA, M. T. R. et al. Caracterização química e bioquímica de goiabas armazenadas sob refrigeração e atmosfera modificada. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1435-1442, Oct. 2007.

XISTO, A. L. R. P. **Conservação pós-colheita de goiaba "Pedro Sato" com aplicação de cloreto de cálcio em condições ambientais**. 2002. 47 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

XISTO, A. L. R. P. et al. Textura de goiabas 'Pedro Sato' submetidas à aplicação de cloreto de cálcio. **Ciências Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 113-118, 2004.

CAPÍTULO 3

Atividade da esterase durante o amadurecimento de goiabas cv. 'Pedro Sato': solubilização de membrana e eletroforese

RESUMO

A cultura da goiaba (*Psidium guajava* L.) apresenta grande importância socioeconômica, dadas às suas amplas e variadas formas de utilização. No entanto, é uma fruta altamente perecível devido ao seu intenso metabolismo durante o amadurecimento. Tem vida útil muito curta, que pode chegar de 3 até 5 dias sob temperatura ambiente. As informações sobre os processos metabólicos e os teores de componentes estruturais durante o amadurecimento são bem contraditórias e não são claramente definidas. Tal fato motivou a pesquisa da esterase como possível enzima envolvida no processo de amadurecimento. A atividade da esterase foi determinada na polpa homogeneizada durante o amadurecimento e nas frações solúvel e de membrana das células da polpa. As esterases solúveis e solubilizadas por Triton X-100 foram submetidas à eletroforese em cilindro de gel de poliacrilamida, e as bandas do gel foram isoladas para análise de atividade. Os resultados obtidos mostraram uma alta atividade esterásica na polpa de goiaba com um pequeno aumento linear com o amadurecimento. Há um predomínio de esterase nas membranas celulares da polpa (84%) em relação à enzima solúvel (16%). A eletroforese da esterase mostrou grande número de isoenzimas, tanto na fração solúvel quanto na solubilizada com grande semelhança na mobilidade da maioria das bandas.

Palavras-chave: Enzimas. Eletroforese. Amadurecimento de goiabas.

ABSTRACT

The guava culture (*Psidium guajava* L.) has a great socioeconomic importance, given its wide and varied forms of use. However, it is a highly perishable fruit due to its intense metabolism during ripening. It has a very short shelf life, which can reach 3 to 5 days at room temperature. Information on the metabolic processes and the levels of structural components during ripening is contradictory and not clearly defined. This fact motivated the research of esterase as a possible enzyme involved in the ripening process. The esterase activity was determined in the homogenized pulp during ripening and in the soluble and membrane fractions of the pulp cells. The soluble esterases and the ones solubilized by Triton X-100 were subjected to electrophoresis in polyacrylamide gel cylinder, and the bands of the gel were isolated for the activity analysis. The results showed a high esterase activity in the guava pulp with a small linear increase with ripening. There is a predominance of esterase in the cell membranes of the pulp (84%), as compared to the soluble enzyme (16%). The esterase electrophoresis showed a large number of isoenzymes both in the soluble and in the solubilized fraction, with a great similarity in the mobility of most bands.

Keywords: Enzymes. Electrophoresis. Guava ripening.

1 INTRODUÇÃO

A goiabeira (*Psidium guajava*) é um arbusto ou árvore pequena (2 a 7 metros de altura) da família das mirtáceas, nativa das regiões tropicais das Américas e cultivada no Brasil desde o Rio Grande do Sul até o Maranhão (SOUZA; MANCIN; MELO, 2003). A goiaba, quando comparada a outras frutas tropicais, se destaca por suas excelentes qualidades nutricionais, pois apresenta elevados teores de vitamina A, B e C, além de suas excelentes propriedades sensoriais (CHOUDHURY, 2001). O Brasil é o maior produtor mundial de goiabas vermelhas e, apesar disso, é um exportador inexpressivo de goiaba *in natura* em decorrência, principalmente, da alta perecibilidade pós-colheita do fruto. Essa alta perecibilidade deve-se ao seu intenso metabolismo durante o amadurecimento, tendo a goiaba uma vida útil que pode chegar de 2 a 5 dias sob temperatura ambiente (CARVALHO, 1994; DURIGAN, 1997).

Durante o amadurecimento de frutos há inúmeras transformações químicas, principalmente relacionadas aos teores de carboidratos, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e pectinas, transformações ocasionadas pela ação de enzimas específicas, podendo-se destacar a pectinametilesterase (PME, EC 3.1.1.11), e a poligalacturonase (PG, EC 3.2.1.15), enzimas capazes de degradar as substâncias pécnicas encontradas na parede celular e na lamela média das células do parênquima de diversos frutos e hortaliças (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Em goiaba, as informações sobre a atividade enzimática são bem contraditórias e os mecanismos que controlam o amadurecimento não têm sido claramente definidos. Em goiaba, não se encontra atividade de PG (ABREU, 2010; LINHARES et al., 2007) ou é muito baixa.

No amadurecimento de frutas, o amaciamento dos tecidos é decorrente da ação de enzimas despolimerizantes, desmetoxilantes e hidrolíticas, como as enzimas pécnicas, em conjunto com celulases, hemicelulases, β -galactosidades e

outras. Entre elas, salientam-se as enzimas pécticas ou pectinolíticas, as quais catalisam a degradação de macromoléculas de pectinas constituídas por unidades de ácido galacturônico. As substâncias pécticas encontram-se, principalmente, depositadas na parede celular, atuando como material cimentante, sendo responsáveis pelas mudanças de textura dos frutos. As esterases catalisam a desesterificação da pectina pela remoção dos grupos metoxil éster (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Mesmo com as contradições citadas na literatura com relação às enzimas PME e PG, os frutos da goiabeira amadurecem, ocorrendo todos os processos de amaciamento do fruto, reforçando a indicação de que a solubilização das pectinas seja também efetuada além das enzimas PME e PG, por outras enzimas diferentes.

Muitos processos envolvem a separação e purificação de materiais biológicos de outras espécies em solução. Tem-se reconhecido a eletroforese como uma técnica poderosa para realizar tais processos, devido à sua alta seletividade e resolução. Tal técnica baseia-se nas diferentes velocidades de migração de moléculas por meio de um gel em um campo elétrico aplicado e, assim, separam-se componentes de uma mistura, com base no tamanho e na carga (HO et al., 1999).

O objetivo deste trabalho foi, então, determinar a atividade de esterase de goiabas da cultivar ‘Pedro Sato’ durante 8 dias de amadurecimento e estudar as isoenzimas esterásicas que possam estar envolvidas no rápido amaciamento através de eletroforese em gel de poliacrilamida.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Procedência e colheita dos frutos

Goiabas (*Psidium guajava* L.) da cv. 'Pedro Sato' cultivadas em pomar, situado no município de Lavras, Minas Gerais, altitude 845m (latitude 21,15° Sul; longitude 45,22° Oeste), foram colhidas no início da manhã, de forma manual, acondicionadas em caixas de polietileno previamente esterilizadas e transportadas ao Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras-MG, onde foram realizadas as análises. Os frutos foram selecionados, lavados em água corrente e imersos em solução de hipoclorito de sódio a 1% e 20°C por 5 minutos para desinfecção. Após secagem da solução de hipoclorito, os frutos (72) foram numerados, colocados em uma estante no laboratório e mantidos por um período de 8 dias à temperatura e umidade relativa de 22°C ± 1°C e 78% ± 1%, respectivamente.

2.2 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo oito tratamentos (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias de amadurecimento). A parcela experimental foi composta de 3 frutos com 3 repetições para cada tratamento. Os resultados são a média de três repetições e desvio padrão da média para cada tratamento. Quando houve diferença significativa, foi aplicada regressão.

2.3 Extração de esterases para os ensaios de atividade enzimática durante os dias de amadurecimento

Para cada tratamento, a extração de esterase da polpa fresca foi feita em almofariz utilizando tampão fosfato $0,22 \text{ mol.L}^{-1}$ e pH 6,5 na proporção de 1:4 (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante (S1) constituiu o extrato de esterase solúvel. O sedimento (SD1) contendo esterase de membrana foi novamente homogeneizado no mesmo tampão na proporção de 1:4 (p/v) acrescido de Triton X-100 2%. Após permanecer 24 horas a 4°C com agitações eventuais, o homogeneizado foi centrifugado a 10000g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante (S2) foi utilizado como esterase solubilizada. O sedimento 2 (SD2) foi utilizado como esterase não solubilizada.

2.4 Determinação da atividade enzimática utilizando 1-naftilacetato e *Fast Blue RR Salt*

A atividade da esterase foi determinada segundo Linhares et al. (2007) durante os dias de amadurecimento, utilizando 0,1 mL do extrato enzimático e 0,1 L do substrato 1-naftilacetato $4,46 \text{ mmol.L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,22 \text{ mol.L}^{-1}$ e pH 6,5. A incubação foi realizada a 30°C , por 4 diferentes intervalos de tempo (10, 20, 30 e 40 minutos), e a reação foi interrompida após cada tempo com 1,0 mL de reagente de cor. Esse reagente foi preparado dissolvendo-se 10,0 g de ácido cítrico em 60 mL de água e o pH foi ajustado para 6,0 com NaOH $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$. Adicionou-se 1 g de SDS e 0,058g de *Fast Blue RR Salt*, e completou-se o volume para 100 mL. A quantidade de 1-naftol liberado foi determinada por leitura em espectrofotômetro a 500 nm. Os resultados foram expressos em miliunidades por grama de polpa fresca. Uma miliunidade de atividade da

esterase foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 nanomol de produto por minuto nas condições do ensaio.

2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

2.5.1 Extração de enzima para realização de eletroforese

Para a realização da eletroforese, a extração da esterase da polpa fresca foi feita em água destilada na proporção de 1:4 (p/v) com adição de polivinilpirrolidona insolúvel a 2% (p/v) e também com adição de esterase, que constitui o homogeneizado; o mesmo foi centrifugado a 10000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante constituiu o extrato de esterase de membrana, que foi novamente homogeneizado em tampão tris (0,025M) / glicina (0,2M) pH 8,9 acrescido de Triton X-100 2% (p/v) e, após 24 horas a 4°C com agitações eventuais, foi centrifugado a 10000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado como esterase solubilizada.

2.5.2 Eletroforese

Foi realizada eletroforese em cilindro com gel de poliacrilamida, segundo Hendrick e Smith (1968), aplicando-se 0,2 mL da esterase solúvel e da esterase solubilizada (referente a todos os tratamentos) por cilindro. A separação eletroforética foi obtida com uma corrente constante de 2,5 mA por gel a 4°C. Os géis foram cortados em frações de 2 mm de espessura com o auxílio de lâminas de aço e os fragmentos contendo as bandas foram colocados em 200µL de tampão fosfato 0,22 mol.L⁻¹ pH 6,5. As frações permaneceram nessa solução por 24 horas a 4°C antes de serem utilizadas no ensaio de esterase em cada fração.

2.6 Determinação da atividade enzimática nas frações dos géis da eletroforese

2.6.1 Determinação colorimétrica usando *Fast Blue RR Salt* a 500 nm no 5º dia de amadurecimento

O quinto dia de amadurecimento foi escolhido pelo fato de que, segundo Abreu (2010), os polímeros de pectina migram para o interior da célula até esse dia, tornando-se assim um dia crítico de atividade enzimática. A atividade esterásica das frações do gel foi então determinada, segundo Linhares et al. (2007), utilizando-se 100µL da enzima extraída de cada fração do gel, acrescida de 100µL de 1-naftilacetato 4,46 mmol.L⁻¹ e incubados a 30°C por 6 horas. Em seguida a reação foi interrompida com o reagente de cor preparado, conforme descrito no item 4.4 e a absorbância do produto obtido foi determinada espectrofotometricamente a 500 nm.

2.6.2 Determinação espectrofotométrica a 322nm em todos os dias de amadurecimento

A atividade esterásica das frações do gel de todos os tratamentos foi determinada segundo Morgan et al. (1994), utilizando-se 100 µL de cada fração do gel, acrescida de 100 µL de 1-naftilacetato 4,46 mmol.L⁻¹ e incubados a 30°C por 6 horas. Em seguida, o ensaio foi submetido a banho de gelo e adicionado ao meio reacional com 1 mL de água. A absorbância do produto obtido a partir da hidrólise do 1-naftilacetato para 1-naftol foi determinada espectrofotometricamente a 322nm.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente foi realizado um ensaio de atividade de acordo com a metodologia descrita no item 4.4 em todos os dias de amadurecimento nas frações extraídas (homogeneizado, sobrenadante 1 – S1, sedimento 1 – SD1, sobrenadante 2 – S2, sedimento 2 – SD2). A atividade da esterase no extrato homogeneizado aumentou linearmente com o amadurecimento da goiaba (Tabela 1). O mesmo comportamento também foi observado na fração solúvel (SI) e na fração de membrana (SDI), cuja soma recuperou $93 \pm 3,7\%$ da atividade do homogeneizado (Tabela 1 e Gráfico 1). As esterases da goiaba encontram-se predominantemente em membrana com uma média de $84 \pm 3,7\%$ da atividade contra $16 \pm 3,7\%$ na fração solúvel.

Tabela 1 Atividade da esterase em mU/g* de polpa fresca e de esterases no extrato homogeneizado, solúveis e de membrana

Dia	Extrato homogeneizado	Esterase solúvel (S1)	% soma	Esterase de membrana (SD1)*	% soma	Soma (S1 + SD1)	% recuperação
0	780±294	72±7	9	713±68	91	785±69	100
1	970±237	68±51	10	602±67	90	670±85	69
2	750±98	112±35	18	516±38	82	628±51	83
3	840±109	110±37	13	730±81	87	840±89	100
4	1050±173	145±9	13	1012±58	87	1157±58	110
5	890±150	137±21	16	719±168	84	856±169	97
6	1000±115	153±36	17	751±62	83	903±71	90
7	1080±115	200±38	19	861±166	81	1061±170	98
Médias			16±3,7		84±3,7		93±12,6

Os resultados são média e desvio padrão da média de 3 repetições contendo 3 frutos cada
 *Uma miliunidade foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 nanomol de 1-naftol por minuto nas condições de ensaio

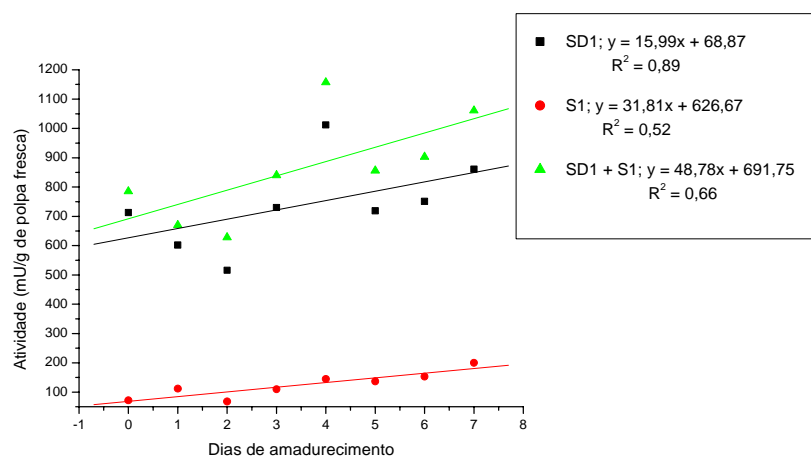


Gráfico 1 Atividade em mU/g de polpa fresca da esterase solúvel (S1), de membrana (SD1) e do homogeneizado (S1 + SD1)

Com o tratamento da fração de membrana (SDI) com Triton X-100, 93 ± 20 da esterase foi solubilizada (Tabela 2), indicando que essa enzima está de alguma forma associada à membrana celular (proteína integrante ou periférica) das células da polpa da goiaba. Observou-se também um aumento relativo na enzima solúvel com o amadurecimento e uma correspondente diminuição da enzima de membrana (Gráfico 2). A fração SD2 não apresentou atividade esterásica.

Tabela 2 Atividade de esterase de membrana solubilizada com Triton X-100 (mU/g de polpa fresca*)

Dias	Esterase da membrana (SDI)*	Esterase solubilizada (S2)	% de solubilização
0	713±68	374±34	52
1	602±67	547±81	109
2	516±38	538±29	104
3	730±81	621±231	85
4	1012±58	783±92	77
5	719±168	772±144	107
6	751±62	733±127	98
7	861±166	950±121	110

Média = 93±20

Os resultados são média e desvio padrão da média de 3 repetições contendo 3 frutos cada
 *Uma miliunidade foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 nanomol de 1-naftol por minuto nas condições de ensaio

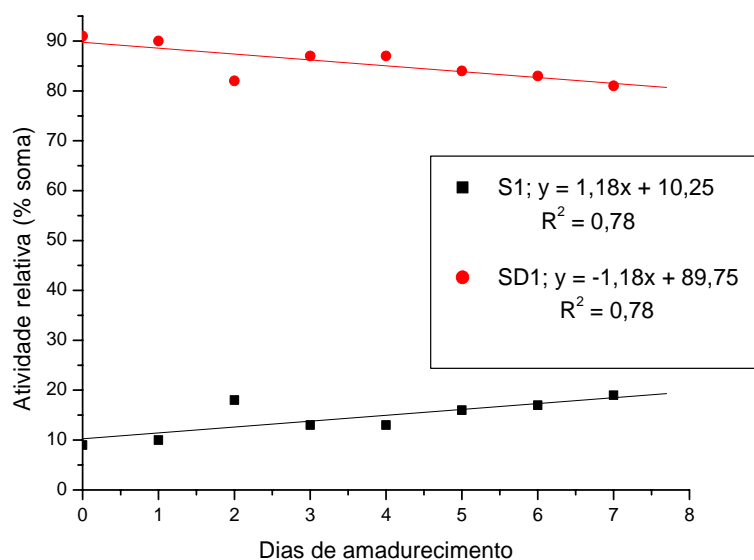


Gráfico 2 Alteração relativa (%) da atividade da esterase com o amadurecimento

Esse aumento na atividade da esterase solúvel e consequente diminuição da atividade da esterase de membrana é um indicativo de que a parede das células está se rompendo com o amadurecimento e liberando essas enzimas, que se tornam solúveis, causando uma diminuição na perda de firmeza do fruto pela ação das enzimas hidrolíticas.

Segundo Jain et al. (2001), Oliveira et al. (2006) e Tucker (1993), a perda de firmeza durante o amadurecimento de frutos se deve à atividade de constituintes da parede celular, principalmente à atividade de pectinametilesterase e poligalacturonase (LINHARES et al., 2007), ou esta é muito baixa e diminui com o amadurecimento (LIMA, 2004; XISTO, 2002) e que a atividade da PME aumenta até o 5º dia e depois diminui (ABREU, 2010) e ainda a descoberta de que os polímeros de pectina são transportados para o interior da célula com o decorrer do amadurecimento (ABREU, 2010). A explicação para a rápida diminuição da firmeza da goiaba provavelmente deve-se à ação conjunta a PME e outras esterases que liberam os polímeros de pectina da parede celular.

Já que essas esterases podem ser responsáveis pela hidrólise de ligações cruzadas entre cadeias de pectinas, liberando os polímeros de pectina que, por um processo ainda desconhecido, migram para o interior da célula até o quinto dia de amadurecimento, resolveu-se fazer análises eletroforéticas das polpas dos frutos referentes do quinto dia de amadurecimento para descobrir quantas enzimas estão presentes neste tratamento tanto na fração solúvel (S1) quanto na solubilizada (S2) (Gráficos 3 e 4).

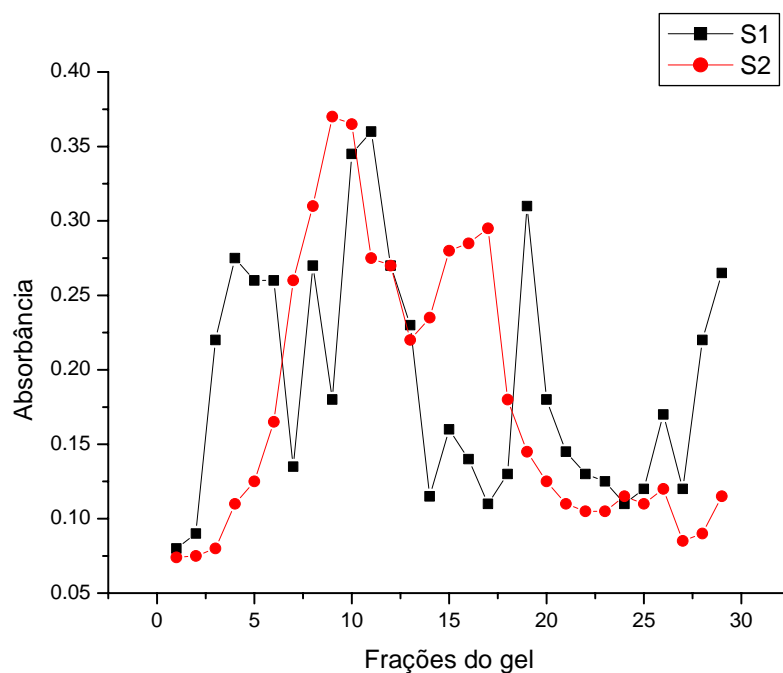


Gráfico 3 Atividade da esterase das frações solúvel (S1) e solubilizada (S2) nas frações do gel de eletroforese d o 5º dia de amadurecimento

A análise dos gráficos de atividades eletroforéticas utilizando *Fast Blue RR Salt* como reagente de cor (Gráfico 3) mostrou um grande número de isoenzimas tanto solúveis quanto de membrana, impossibilitando assim a indicação daquele pico responsável pela liberação de polímeros de pectina que são transportados para o interior da célula (provavelmente o vacúolo) (ABREU, 2010). Esse intenso aumento na expressão dos picos esterásicos nos géis de poliacrilamida pode ter ocorrido pelo fato de existirem muitas isoenzimas esterásicas em plantas, além de que a revelação com *Fast Blue RR Salt* pode ocorrer com outros compostos fenólicos, principalmente com aqueles presentes na própria parede celular.

Para avaliar apenas a atividade esterásica sobre o 1-naftilacetato, as atividades nas frações do gel foram determinadas segundo Morgan et al. (1994), através da leitura da absorbância a 322 nm, no mesmo quinto dia de amadurecimento. Curiosamente, nesse dia de amadurecimento, a atividade nas frações do gel não mostrou picos (Gráfico 4), diferentemente das análises realizadas utilizando o *Fast Blue RR Salt* como reagente de cor (Gráficos 3 e 4), que apresentaram grande número de isoenzimas.

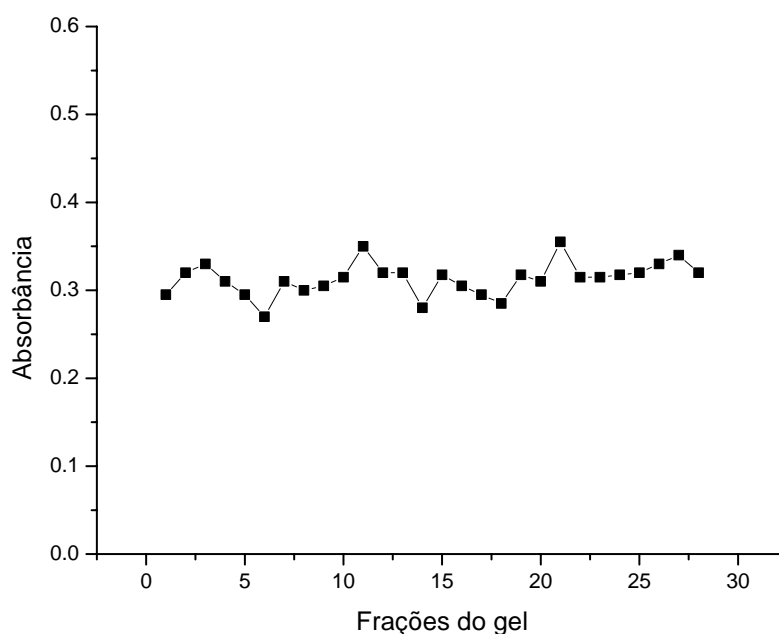


Gráfico 4 Atividade da esterase da fração solúvel (S1) nas frações do gel de eletroforese do 5º dia de amadurecimento

A ausência de picos de esterase no dia 5 levou a duas hipóteses: 1) se realmente esse substrato não é clivado pelas esterases de goiaba e; 2) se as esterases que hidrolisam esse substrato já perderam a sua atividade até o quinto

dia de amadurecimento. Esta última hipótese é muito interessante, porque está de acordo com a mobilidade dos polímeros de pectina para o interior da célula (ABREU, 2010), que praticamente termina no quarto dia de amadurecimento. Se houver a atividade sobre esse substrato nas eletroforeses dos dias anteriores ao dia 5, poderia ser sugerido com mais segurança que essas esterases solúveis em todos os dias de amadurecimento (Gráfico 5) mostraram grande número de picos nos primeiros dias (Dias 0, 1 e 2) e sua diminuição da atividade com o amadurecimento, culminando com a ausência da atividade como já observado no dia 5. Tendo em vista que a goiaba não apresenta atividade de poligalacturonase (LINHARES et al., 2007), ou esta é muito baixa e diminui com o amadurecimento (LIMA, 2004; XISTO, 2002), possivelmente sejam essas isoenzimas, juntamente com a pectinametilsterase, que estejam envolvidas na perda de firmeza da polpa do fruto.

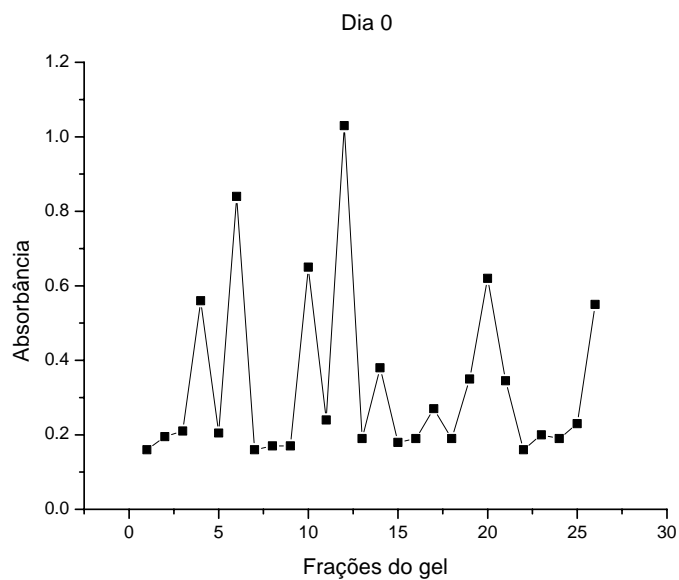


Gráfico 5A Atividade da esterase nas frações do gel de eletroforese da fração solúvel (dia 0 de amadurecimento)

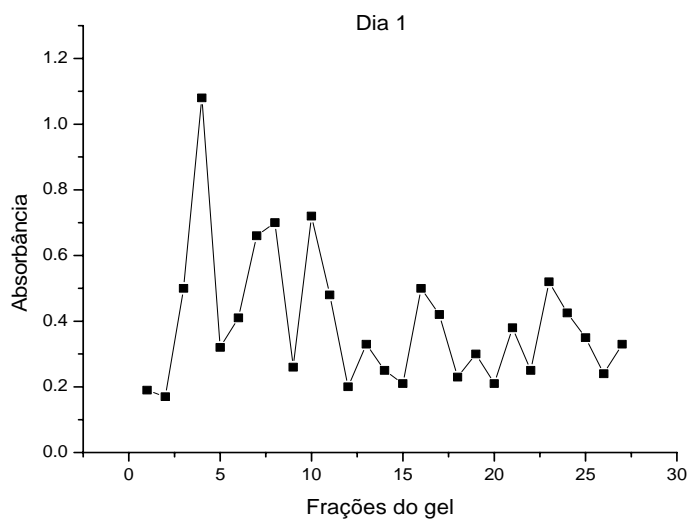


Gráfico 5B Atividade da esterase nas frações do gel de eletroforese da fração solúvel (dia 1 de amadurecimento)

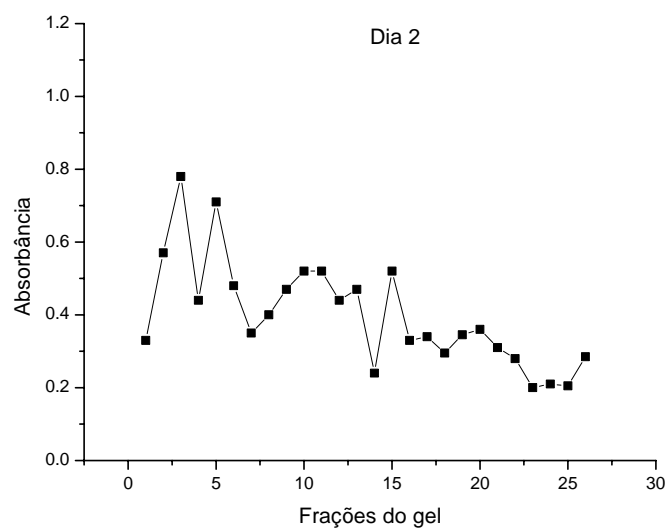


Gráfico 5C Atividade da esterase nas frações do gel de eletroforese da fração solúvel (dia 2 de amadurecimento)

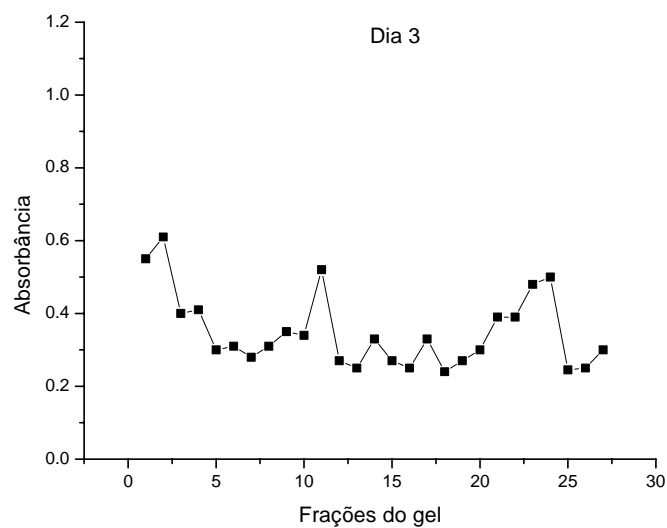


Gráfico 5D Atividade da esterase nas frações do gel de eletroforese da fração solúvel (dia 3 de amadurecimento)

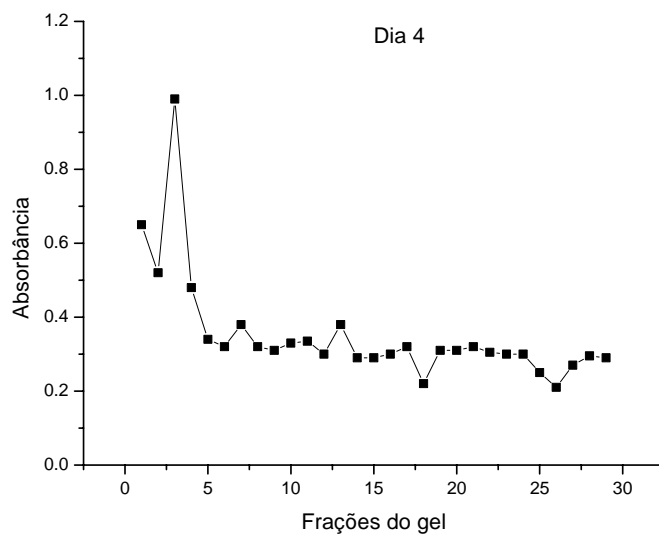


Gráfico 5E Atividade da esterase nas frações do gel de eletroforese da fração solúvel (dia 4 de amadurecimento)

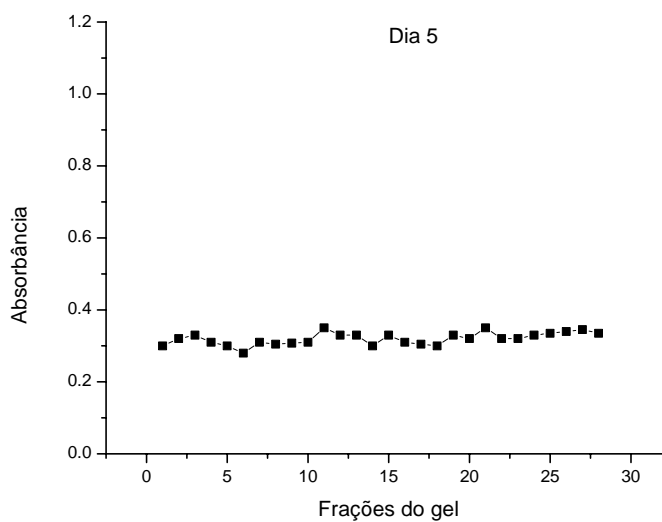


Gráfico 5F Atividade da esterase nas frações do gel de eletroforese da fração solúvel (dia 5 de amadurecimento)

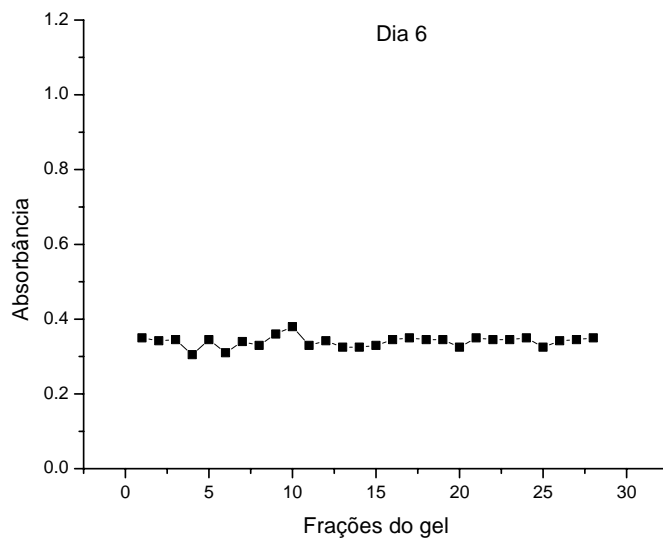


Gráfico 5G Atividade da esterase nas frações do gel de eletroforese da fração solúvel (dia 6 de amadurecimento)

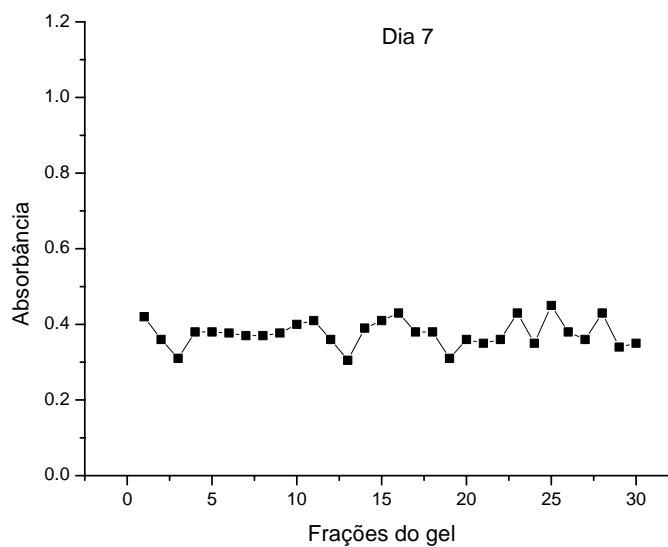


Gráfico 5H Atividade da esterase nas frações do gel de eletroforese da fração solúvel (dia 7 de amadurecimento)

4 CONCLUSÃO

- a) foi possível perceber um aumento da atividade da esterase sobre o 1-naftilacetato durante o amadurecimento;
- b) eletroforese – alta síntese de isoenzimas nos primeiros dias após a colheita, seguida de decréscimo durante o amadurecimento;
- c) Esterases (associadas à PME) – responsáveis pela perda de firmeza da polpa do fruto.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. R. **Monitoramento de alterações físicas, químicas e fisiológicas durante o amadurecimento de goiabas cv 'Pedro Sato'**. 2010. 94 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- CARVALHO, V. D. Qualidade e conservação pós-colheita de goiabas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.17, n.179, p. 48-54, 1994.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manejo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.
- CHOUDHURY, M. M. **Goiaba: pós-colheita**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 45 p. Disponível em: <<http://www.prodemb.cnptia.embrapa.br/busca.jsp?baseDados=PRODEMB&unidade=ODAS&fraseBusca=%22CHOUDHURY,%20M.%20M.%22%20em%20AUT&posicaoRegistro=76&formFiltroAction=N&View=80694>>. Acesso em: 21 maio 2012.
- DURIGAN, J. F. Colheita, conservação e embalagens. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA GOIABEIRA, 1., 1997, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1997. p.149-158.
- HENDRICK, J. L.; SMITH, A. J. Size and charge separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. **Archives in Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 126, n. 1, p. 155-164, July 1968.
- HO, A. K. et al. Measurement and theoretical modeling of protein mobility through membranes. **AIChE Journal**, New York, v. 45, p. 1434–1450, 1999.
- JAIN, N. et al. Compositional and enzymatic changes in guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v. 23, p. 357-362, 2001.
- LIMA, A. V. **Qualidade pós-colheita da goiaba Pedro Sato tratada com cloreto de cálcio e 1-MCP em condições ambiente**. 2004. 67 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

LINHARES, L. A. et al. Transformações químicas, físicas e enzimáticas de goiabas “Pedro Sato” tratadas na pós-colheita com cloreto de cálcio e 1-metilciclopropeno e armazenadas sob refrigeração. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 829-841, 2007.

MORGAN, E. W. et al. Purification and characterization of two rat liver microsomal carboxylesterases (hidrolase A and B). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 315, n. 2, p. 495-512, 1994.

OLIVEIRA, A. C. G. et al. Conservação pós-colheita de goiaba branca Kumagai por irradiação gama: aspectos físicos, químicos e sensoriais. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 375-396, 2006.

SOUZA, O. P.; MANCIN, C. A.; MELO, B. **Cultura da goiabeira**. Uberlândia: UFU, 2003. Disponível em: <<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/goiabao.html>>. Acesso em: 10 maio 2012.

TUCKER, G. A. Introduction. In: SEYMOUR, G. B.; TAYLOR, J. E.; TUCKER, G. A. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman & Hall, 1993. cap.1, p. 2-51.

XISTO, A. L. R. P. **Conservação pós-colheita de goiaba “Pedro Sato” com aplicação de cloreto de cálcio em condições ambientais**. 2002. 47 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

ANEXOS

Tabela 1A Resumo da análise de variância para 2 métodos de extração de pectina (frações solúvel, insolúvel, resíduo e total) de goiabas 'Pedro Sato' durante 8 dias de amadurecimento

FV*	QM				
	GL	PS	PI	RP	PT
Dias	7	0,407095	0,336194	0,010363	0,016705
Métodos	1	2,212656	50,327201	0,044100	79,165506
	CV%	9,50	3,32	2,73	2,06

* Teste F significativo a 5% de probabilidade

Tabela 2A Resumo da análise de variância para açúcares totais das frações de pectina solúvel, insolúvel, resíduo e total em goiabas 'Pedro Sato' durante 8 dias de amadurecimento

FV*	QM				
	GL	PS	PI	RP	PT
Dias	7	0,584671	5,114759	2,813937	19,604399
Métodos	1	5,941058	529,752697	4,411681	845,384927
	CV%	66,37	18,59	7,51	7,71

* Teste F significativo a 5% de probabilidade