



**MARIANA APARECIDA BRAGA**

**PAREDE CELULAR: ANÁLISES DO  
MECANISMO DE PERDA DE FIRMEZA DE  
GOIABAS cv. PEDRO SATO DURANTE O  
AMADURECIMENTO EM TEMPERATURA  
AMBIENTE**

**LAVRAS – MG**

**2015**

**MARIANA APARECIDA BRAGA**

**PAREDE CELULAR: ANÁLISES DO MECANISMO DE PERDA DE  
FIRMEZA DE GOIABAS *cv.* PEDRO SATO DURANTE O  
AMADURECIMENTO EM TEMPERATURA AMBIENTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Celeste Maria Patto de Abreu

**LAVRAS - MG**

**2015**

**Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Braga, Mariana Aparecida.

Parede Celular: análises do mecanismo de perda de firmeza de  
goiabas cv. Pedro Sato durante o amadurecimento em temperatura  
ambiente / Mariana Aparecida Braga. – Lavras : UFLA, 2015.

94 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)—Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientador(a): Celeste Maria Patto de Abreu.

Bibliografia.

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

**MARIANA APARECIDA BRAGA**

**PAREDE CELULAR: ANÁLISES DO MECANISMO DE PERDA DE  
FIRMEZA DE GOIABAS cv. PEDRO SATO DURANTE O  
AMADURECIMENTO EM TEMPERATURA AMBIENTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2015.

Dr. Paulo Sérgio Castilho Preté      UFLA

Dr. Enio Nazaré de Oliveira Júnior      UFSJ

Dra. Celeste Maria Patto de Abreu  
(Orientadora)

**LAVRAS – MG**

**2015**

Aos meus pais, Carlos e Edwiges, pelo exemplo de perseverança, que em meio às dificuldades, tiveram amor, coragem e sabedoria, incentivando-me, sempre, para que eu seguisse em frente. Serão eternamente a minha maior inspiração.

## **OFEREÇO**

Ao meu irmão, Carlos Henrique, pela admiração, companheirismo e amizade. Ao meu noivo, Alison, pela confiança, paciência, amor e principalmente pela força.

## **DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por guiar os meus passos em todos os momentos, e à Nossa Senhora Aparecida pela poderosa intercessão.

Ao professor Custódio Donizete dos Santos, pela orientação, incentivo e por quem tenho profunda admiração e respeito.

À professora Celeste Maria Patto de Abreu, pela orientação, generosidade em compartilhar suas experiências, pela confiança, incentivo e apoio. Agradeço pela presença constante na minha vida profissional.

À professora Luciana Lopes Silva Pereira, pela disponibilidade e direcionamento nas análises e pelo constante espírito de colaboração e paciência.

A todos os professores do Mestrado, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica (Tamara, Pricila, Adneia, Lucimara, Estela, Flávia, Lucas, Vinícius e Anderson) pela ajuda, companheirismo e por me acalmarem em momentos de aflição.

Às alunas de iniciação científica, Laís e Aline, pela dedicação e responsabilidade.

Aos colegas de curso, pelo incentivo, solidariedade e pela troca de experiências.

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

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os meus familiares, especialmente minha avó Edwiges, pelo apoio e orações.

Enfim, a todos que contribuíram de uma forma ou outra, para que este trabalho se realizasse.

**MUITO OBRIGADA**

## RESUMO

A goiaba é considerada um fruto bastante atrativo, em razão de sua cor e agradável aroma, além de ser uma das mais completas e equilibradas frutas no que diz respeito ao valor nutritivo, contendo alto teor de vitamina C, quantidades razoáveis de vitaminas A e B e sais minerais, como cálcio, fósforo e ferro. Devido ao seu intenso metabolismo durante o amadurecimento, a goiaba é um fruto altamente perecível, com uma vida útil que pode chegar de três até cinco dias sob temperatura ambiente. A firmeza dos frutos verdes e maduros está relacionada principalmente 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 da parede celular. Diante do exposto, com a finalidade de tentar explicar a rápida diminuição da firmeza, investigou-se a composição da parede celular da goiaba, as interligações entre suas cadeias e os compostos fenólicos ligados, bem como os processos enzimáticos envolvidos na liberação e transporte dos polímeros de pectina para o interior da célula. Goiabas foram colhidas no estágio “de vez” e armazenadas por oito dias a uma temperatura de  $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e UR de  $53\% \pm 1\%$ . As análises realizadas no dia da colheita (dia 0) e a cada dia do armazenamento foram: perda de massa, firmeza, compostos fenólicos, espectrometria de absorção na região do infravermelho, extração de pectinas por três métodos distintos e análises enzimáticas da  $\beta$ -D-glicosidase e esterase. Os resultados mostraram que a firmeza dos frutos diminuiu bruscamente nos quatro primeiros dias de amadurecimento, coincidindo com o aumento da atividade da  $\beta$ -D-glicosidase nesse mesmo período. Foram identificados três compostos fenólicos por HPLC e a presença de outros picos não identificados, sendo que dois desses despertaram a atenção, pois tiveram seus teores aumentados durante os dias de amadurecimento. Os teores de pectina pelo método de extração utilizando as enzimas celulase e hemicelulase foram maiores (6,7%) que os teores de pectina citados na literatura (2,5%), o que pode explicar melhor o papel da pectina na firmeza do fruto. A atividade das esterases foi maior nas membranas celulares da polpa (57%) em relação à enzima solúvel (8,61%), indicando que essas esterases de parede são responsáveis, juntamente com a  $\beta$ -D-glicosidase, pela liberação dos polímeros de pectina.

**Palavras-chave:** Pectina. Compostos Fenólicos.  $\beta$ -D-glicosidase. Esterase.

## ABSTRACT

Guava is considered a quite attractive fruit, due to its color and pleasant aroma, besides being one of the most complete and balanced fruits in terms of its nutritional value, containing high vitamin C levels, reasonable amounts of vitamins A and B and mineral salts such as calcium, phosphorus and iron. Due to its intense metabolism during ripening, guava is a highly perishable fruit, with a very short shelf life, that can reach from three to five days under room temperature. The firmness of green and ripe fruits is mainly related to pectin polymers. The loss of firmness during guava ripening is due to the activity of hydrolytic enzymes, which causes an intense solubilization of cell wall pectins. Given the above, with the objective to try to explain the rapid decrease in firmness, the cell wall composition of guava was investigated, as well as interconnectors between its chains and bound phenolic compounds and enzymatic processes involved in the release and transport of pectin polymers into the cell. Guavas were picked at the "semi-mature" stage and stored for eight days at a temperature of  $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  and RH of  $53\% \pm 1\%$ . The analyses conducted on the harvest day (0) and on each day of storage were: weight loss, firmness, phenolic compounds, absorption spectrometry in the infrared region, pectin extraction by three different methods and enzymatic analyses of  $\beta$ -D - glycosidase and esterase. The results show that the firmness of the fruit decreased sharply on the first four days of ripening, coinciding with the increase in the activity of  $\beta$ -D-glucosidase in the same period. Three phenolic compounds were identified by HPLC, and the presence of other unidentified peaks, two of which aroused the attention, since their levels increased during the days of ripening. The contents of pectin by the extraction method using cellulase and hemicellulase were higher (6.7%) than the pectin content in the cited literature (2.5%), which may further explain the role of pectin in fruit firmness. The activity of esterase was greater in the cell membranes of the pulp (57%) compared to the soluble enzyme (8.61%), indicating that these wall esterases are responsible, together with  $\beta$ -D-glucosidase, for the release of the polymer pectin.

**Keywords:** Pectin. Phenolic Compounds.  $\beta$ -D-glucosidase. Esterase.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da parede celular vegetal.....	22
Figura 2	Estrutura química da cadeia de pectina.....	25
Figura 3	Porcentagem de perda de massa de goiabas cv. Pedro Sato armazenadas sob condições ambientais.....	42
Figura 4	Alterações ocorridas em goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de armazenamento em temperatura ambiente.....	43
Figura 5	Curva e equação de regressão representativa dos valores de firmeza de goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de armazenamento, sob condições ambientais.....	45
Figura 6	Análise de regressão representativa dos valores de compostos fenólicos em goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de armazenamento, sob condições ambientais.....	47
Figura 7	Cromatograma dos padrões utilizados. Identificação dos picos: 1- ácido gálico (tempo = 6,599); 2- catequina (tempo = 10,459); 3- galato de epigalocatequina (tempo = 12,314); 4- epicatequina (tempo = 14,290); 5- ácido siríngico (tempo = 15,912); 6- ácido p-cumárico (tempo = 20,578); 7- ácido ferúlico (tempo = 23,744); 8-ácido salicílico (tempo = 32,498); 9- resveratrol (tempo = 36,266); 10-quercetina (tempo = 51,589).....	49
Figura 8	Cromatograma do extrato da polpa de goiaba durante oito dias de amadurecimento. Tempos de retenção médios dos compostos fenólicos identificados: ácido gálico (tempo = 6,515 ± 0,016); catequina (tempo = 10,408 ± 0,036); galato de epigalocatequina (tempo = 12,164 ± 0,073).....	50
Figura 9	Estruturas dos compostos fenólicos identificados: (A) ácido gálico. (B) catequina. (C) galato de epigalocatequina.....	51
Figura 10	Caracterização espectroscópica FT-IR das substâncias pécnicas. (A) padrão ácido galacturônico. (B) pectina comercial.....	53
Figura 11	Espectro de infravermelho da fração pectina solúvel durante oito dias de amadurecimento.....	55
Figura 11A	Espectro de infravermelho da fração pectina insolúvel utilizando celulase e hemicelulase durante oito dias de amadurecimento.....	57
Figura 11B	Espectro de infravermelho da fração pectina insolúvel utilizando celulase, hemicelulase e pectinase durante oito dias de amadurecimento.....	58

Figura 12	Análise de regressão representativa dos valores de pectina solúvel em goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de armazenamento.....	60
Figura 13	Análise de regressão representativa dos valores de pectina total pelo método McCready e McCoomb (PT 1), utilizando celulase (PT 2), e celulase e hemicelulase (PT 3) de goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de armazenamento.....	63
Figura 14	Análise de regressão representativa dos valores da atividade de $\beta$ -D-glicosidase no sobrenadante de goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de armazenamento utilizando como substrato p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo.....	64
Figura 15	Análise de regressão representativa dos valores da atividade de $\beta$ -D- glicosidase no sobrenadante de goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de armazenamento utilizando como substrato salicina.....	66
Figura 16	Atividade em mU/g de polpa fresca da esterase solúvel (SOB1) e do homogeneizado (HOM).....	69
Figura 17	Atividade em mU/g de polpa fresca da esterase solúvel (SOB1), de membrana (SED1) e do homogeneizado (HOM)..	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentração dos compostos fenólicos: ácido gálico, catequina e galato de epigalocatequina em goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de armazenamento.....	51
Tabela 2	Teores médios (em porcentagem) das frações de pectina insolúvel (PI) de acordo com três métodos distintos de extração durante o amadurecimento de goiabas cv. Pedro Sato.....	61
Tabela 3	Atividade da esterase no extrato homogeneizado (mU/g* de polpa fresca).....	67
Tabela 4	Atividade da esterase em mU/g* de polpa fresca nos extratos solúvel e de membrana .....	68
Tabela 5	Atividade da esterase de membrana solubilizada com Triton X-100 (mU/g* de polpa fresca).....	70
Tabela 6	Atividade da esterase em mU/g* de polpa fresca nos extratos homogeneizado, solúvel e de membrana.....	72
Tabela 7	Atividade da esterase de membrana solubilizada com Triton X-100 (mU/g* de polpa fresca).....	74

## LISTA DE SIGLAS

DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FT-IR	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho
HOM	Homogeneizado
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
PI	Pectina Insolúvel
PS	Pectina Solúvel
PT	Pectina Total
PME	Pectinametilesterase
PG	Poligalacturonase
pNPβG	p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo
SDS	dodecil sulfato de sódio
SED	Sedimento
SOB	Sobrenadante
UR	Umidade Relativa

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	Goiaba: aspectos gerais.....	17
2.2	Amadurecimento.....	19
2.3	Parede celular: aspectos gerais.....	21
2.4	Substâncias Pécicas.....	22
2.5	Enzimas da parede celular.....	25
2.6	Compostos Fenólicos.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1	Procedência e colheita dos frutos.....	30
3.2	Preparo dos frutos.....	30
3.3	Preparo da amostra.....	30
3.4	Delineamento experimental.....	31
3.5	Análises físicas e químicas.....	31
3.5.1	Perda de massa.....	31
3.5.2	Firmeza.....	31
3.5.3	Compostos Fenólicos.....	32
3.5.3.1	Identificação e quantificação dos compostos fenólicos.....	32
3.6	Extração de pectinas.....	33
3.6.1	Pectina para análise de Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR).....	34
3.6.2	Pectina total e solúvel.....	35
3.6.3	Pectina com celulase em tampão citrato fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 4,8.....	36
3.6.4	Pectina com celulase e hemicelulase em tampão citrato fosfato 0,1mol L <sup>-1</sup> , pH 4,8.....	37
3.7	Análises Enzimáticas.....	37
3.7.1	β-D-glicosidase com salicina.....	37
3.7.2	β-D-glicosidase com pNPβG.....	38
3.7.3	Esterase.....	39
3.7.3.1	Extração.....	39
3.7.3.2	Determinação da atividade da esterase utilizando α-naftilacetato e <i>Fast Blue RR Salt</i> .....	39
3.7.3.3	Determinação da atividade da esterase utilizando α-naftilacetato leitura espectrofotométrica a 322 nm.....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1	Perda de massa dos frutos.....	41

4.2	<b>Firmeza</b> .....	44
4.3	<b>Compostos Fenólicos</b> .....	46
4.4	<b>Análises Espectroscópicas na Região do Infravermelho</b> .....	52
4.5	<b>Teores de pectina</b> .....	59
4.6	<b>Atividade de <math>\beta</math>-D-glicosidase</b> .....	63
4.7	<b>Atividade de esterase</b> .....	67
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	75
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	76
	<b>ANEXOS</b> .....	92

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, com uma colheita que excede 40 milhões de toneladas anuais. Com um alto consumo interno, especialmente pela melhora da renda dos brasileiros, o país tem se destacado também nas crescentes exportações. O setor de fruticultura está entre os principais geradores de renda, emprego e de desenvolvimento rural do agronegócio nacional (ANUÁRIO..., 2013). Entre as frutíferas cultivadas no Brasil, a goiaba (*Psidium guajava* L.) destaca-se pela alta atividade rentável e pela grande possibilidade de expansão no país.

O Brasil é o maior produtor mundial de goiabas vermelhas. As exportações são destinadas ao mercado europeu sem qualquer tratamento pós-colheita (VIEIRA et al., 2014). O Estado de São Paulo é responsável por mais de 60% do volume nacional desta fruta, onde são cultivadas variedades de polpa branca, destinadas para consumo *in natura* e as de polpa vermelha, para consumo *in natura* e para indústria (MORGADO et al., 2010).

Apesar de maior produtor, o Brasil é exportador inexpressivo de goiaba *in natura*, principalmente pela alta perecibilidade pós-colheita do fruto. Isso requer transporte aéreo o que resulta em alto custo operacional (OLIVEIRA, A. et al., 2006).

A goiaba é considerada um fruto bastante atrativo, em razão de sua cor e agradável aroma, além de ser uma das mais completas e equilibradas frutas no que diz respeito ao valor nutritivo, contendo alto teor de vitamina C, com valores seis a sete vezes superiores ao dos frutos cítricos. Apresenta quantidades razoáveis de pró-vitamina A, vitaminas do complexo B, além de conter teores significativos de cálcio, fósforo e ferro (COSER et al., 2012; MANICA et al., 2000).

O conhecimento das propriedades químicas e físicas da goiaba é um fator altamente relevante, uma vez que eles são utilizados como referência para a aceitabilidade das mesmas no mercado nacional e internacional. Entre as características químicas, pode-se destacar: o pH, a acidez titulável e os teores de proteína e, entre as características físicas, pode-se destacar: firmeza, peso do fruto, o diâmetro longitudinal e transversal, e a resistência da polpa (SOUZA et al., 2009). A firmeza é o atributo de maior importância, porque além de definir a qualidade do fruto para o consumo *in natura* e para o processamento, contribui para sua vida útil pós-colheita, pois auxilia na resistência ao transporte e ao ataque de microrganismos. A diminuição da firmeza durante o amadurecimento tem sido atribuída a modificações e degradação dos componentes da parede celular (VILAS BOAS et al., 2013), bem como à diminuição da integridade do fruto (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Durante o amadurecimento de frutos, a perda de firmeza e as diversas transformações químicas, principalmente relacionadas aos teores de carboidratos, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e pectinas, são comumente associadas à ação de enzimas específicas, como: pectinametilesterase (PME) e a poligalacturonase (PG), enzimas capazes de degradar as substâncias pécticas, encontradas na parede celular e na lamela média das células do parênquima de diversos frutos e hortaliças (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Porém, em goiaba, a atividade de PG não é encontrada (LINHARES et al., 2007), ou ela é muito baixa, tornando as informações sobre a atividade dessas enzimas contraditórias e os mecanismos que controlam o amadurecimento não claramente definidos.

O amaciamento dos tecidos, durante o amadurecimento dos frutos, é decorrente da ação de enzimas despolimerizantes, desmetoxilantes e hidrolíticas, como as enzimas pécticas, em conjunto com celulases, hemicelulases,  $\beta$ -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 firmeza dos frutos. As esterases catalisam a desesterificação da pectina pela remoção dos grupos metoxil éster (CHITARRA; CHITARRA, 2005; ORTIZ; GRAELL; LARA, 2011).

Segundo Abreu et al. (2012a), com o decorrer do amadurecimento de goiaba cv. Pedro Sato, a pectina da parede celular migra de forma gradativa para o interior da célula, provavelmente em vacúolos, contudo, a função da migração das pectinas é, ainda, um processo inexplicável.

O amadurecimento da goiaba é um processo complexo, altamente coordenado em diversos níveis metabólicos correlacionados ao seu desenvolvimento na planta. O conhecimento das transformações ocorridas durante esse processo é importante para melhor esclarecimento e para estabelecer bases científicas para o desenvolvimento de novas tecnologias de conservação pós-colheita, aumentando consequentemente, a vida útil desses frutos (ABREU et al., 2012a).

Diante do exposto, com a finalidade de tentar elucidar a rápida diminuição da firmeza durante o amadurecimento da goiaba cv. Pedro Sato, objetivou-se com este trabalho investigar a composição da parede celular da goiaba, com destaque para as pectinas, as interligações entre suas cadeias e os compostos fenólicos ligados, bem como os processos enzimáticos envolvidos na liberação e transporte dos polímeros para o interior da célula.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Goiaba: aspectos gerais

*Psidium guajava* L., popularmente conhecida como goiaba, pertencente à família *Myrtaceae*, teve origem na América tropical e se difundiu nas regiões tropicais e subtropicais devido à sua facilidade de se disseminar por meio de suas sementes e em solos arenosos, sendo considerada uma espécie invasora em algumas áreas (FLORES et al., 2015; YAMAMOTO et al., 2010). Existem aproximadamente 324 espécies de goiaba conhecidas nas regiões tropicais da América Central e América do Sul. Do gênero *Psidium*, as variedades mais difundidas são Paluma, Pedro Sato, Ogawa e Kumagai (LIMA et al., 2010).

O Brasil é um dos três maiores produtores mundiais de goiaba. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2012), o país produziu, em 2012, 345.300 toneladas de goiaba, e essa produção concentrou-se, principalmente, nas regiões Sudeste e Nordeste, sendo os Estados de São Paulo e Pernambuco os maiores produtores. Minas Gerais produziu 15.900 toneladas de goiaba, ocupando a terceira posição na produção nacional. As regiões Zona da Mata e Central foram as principais produtoras de Minas Gerais, respondendo, juntas, por 56,6% do volume estadual.

A goiaba é um dos frutos de maior importância nas regiões tropicais e subtropicais, não só devido ao seu elevado valor nutritivo, mas também pela excelente aceitação do consumo *in natura*, sua grande aplicação industrial, e capacidade de se desenvolver em condições adversas de clima (CAMPOS et al., 2011). O fruto pode ser consumido *in natura* e, principalmente, na forma industrializada de goiabada, geleias, pastas, fruta em calda, purê, alimentos para criança, base para bebidas, refrescos, sucos e xaropes. Em 2005, o guatchup, foi desenvolvido pela empresa CNJ Internacional com a colaboração da Associação

Brasileira dos Produtores de Goiaba, apresentando um elevado valor nutricional, rico em licopeno, betacaroteno, vitamina C, ferro, cálcio e fibras sendo menos calórico em relação ao seu concorrente feito de tomate (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA - IEA, 2005).

A goiaba destaca-se devido, principalmente, a três fatores: elevado teor nutritivo (é uma das melhores fontes de vitamina C, apresenta elevado teor de vitaminas dos grupos A e B, além de açúcares, fósforo, ferro e cálcio); excelentes propriedades sensoriais (possui sabor e aroma característicos) e alto rendimento por hectare /polpa de elevada qualidade industrial (o que permite seu uso para o desenvolvimento de novos produtos) (MANICA et al., 2000). Comparada com outros frutos, a goiaba vermelha oferece elevados teores de licopeno, e a goiaba branca, de vitamina C e fibras (PINTO et al., 2010).

Na goiaba, assim como na maioria dos frutos, a firmeza da polpa é um atributo importante, porque, 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 de pectinases, as fibras vão sendo hidrolisadas ou liberadas da parede celular, acarretando redução de sua firmeza (MENDONÇA et al., 2007). Altamente perecível, devido ao seu intenso metabolismo durante o amadurecimento, a goiaba tem vida útil que pode chegar de três até cinco dias sob temperatura ambiente (ABREU et al., 2012b; CAMPOS et al., 2011 ).

A goiaba é um fruto com altas taxas de respiração e uma vida útil muito curta após a colheita, resultado da perda de firmeza da polpa, o que limita o período de transporte e armazenamento. Esse é um aspecto que dificulta ou até mesmo impossibilita o envio de frutos a mercados consumidores distantes (BATISTA et al., 2009). Os principais aspectos de sua deterioração envolvem o rápido amolecimento dos frutos, a perda de coloração verde e do brilho da casca,

o murchamento e a incidência de podridões. Tem ainda, como desvantagem a sazonalidade que dificulta a oferta durante o ano inteiro, sendo necessário o emprego de processos de conservação que proporcionem tal durabilidade (REIS et al., 2007).

## **2.2 Amadurecimento**

Amadurecimento 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 definido como a sequência de mudanças na cor, sabor, aroma e firmeza (CHITARRA; CHITARRA, 2005). A mudança quantitativa mais importante durante o amadurecimento de muitos frutos é a hidrólise de polímeros de carboidratos, dos quais a hidrólise de amido e sua conversão em açúcares menores contribuem para o sabor agradável e a hidrólise de pectinas que é normalmente responsável pelo amaciamento dos frutos (AWAD, 1993; PONCE et al., 2010).

No amadurecimento, ocorrem reações de síntese e de degradação; nas reações de degradação, a energia liberada é utilizada para várias atividades fisiológicas e para a manutenção da integridade celular. Uma grande demanda de energia ocorre no fruto durante o processo de amadurecimento, incluindo síntese proteica, síntese de etileno e compostos aromáticos, entre outros, e a interação de mecanismos pelos quais essas mudanças são coordenadas ainda não é bem conhecida (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

O amaciamento dos frutos é um dos principais fatores na determinação de sua qualidade e influencia a aceitação por parte dos consumidores. A vida de prateleira, danos físicos e ataque por patógenos durante o manuseio e conservação pós-colheita também são afetados pelo amolecimento que aumenta

proporcionalmente com a perda da firmeza (AMNUAYSIN; JONES; SERAYPHEAP, 2012).

Em frutos, o amaciamento dos tecidos implica em modificações de polissacarídeos da parede celular. Os reflexos econômicos desse amaciamento têm estimulado o desenvolvimento de uma série de pesquisas envolvendo bases bioquímicas do metabolismo da parede celular durante o amadurecimento (YAMAMOTO et al., 2011). Para Xisto et al. (2004), a firmeza dos frutos é um atributo de qualidade estreitamente relacionado com a solubilização de substâncias pécticas que estão localizadas na parede celular e lamela média. Em goiabas cv. Pedro Sato, a perda de firmeza se deve ao acelerado processo de liberação de polímeros de pectina das paredes celulares (ABREU et al., 2012a).

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 firmeza, que está associada com a solubilização de substâncias pécticas. Os frutos com uma elevada porcentagem de pectina solúvel são geralmente mais macios e pouco resistentes às doenças e transporte.

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 desorganização. Mesmo que o crescimento tenha cessado, a desorganização seletiva dos componentes da parede celular e a separação célula a célula são muito pronunciadas. Durante o amadurecimento dos frutos, esta desorganização e separação podem ser a chave para o evento metabólico associado ao amadurecimento, que determina o tempo e a extensão de perda da adesão celular, acarretando no amaciamento do fruto (FADDA; MULAS, 2010).

### 2.3 Parede celular: aspectos gerais

A parede celular vegetal é constituída principalmente de polissacarídeos, como a celulose, hemicelulose e pectina, que em conjunto com proteínas e lignina formam uma estrutura rígida e complexa (Figura 1). Cada um destes componentes apresentam complexidades estruturais e papéis fisiológicos diferentes nas plantas (ZAIDEL; MEYER, 2012). Apesar de uma grande variação na composição e estrutura anatômica das paredes celulares vegetais, existe uma faixa de conteúdo médio destes componentes, a celulose correspondendo a aproximadamente 35-50% do peso da planta seca, hemicelulose e pectina de 20-35% e lignina entre 5-30% (ARO; PAKULA; PENTTILA, 2005; LYND et al., 2002). Os constituintes da parede celular primária e da lamela média podem variar em conteúdo e estrutura química dependendo do fruto e do estágio de desenvolvimento (PAIVA; LIMA; PAIXÃO, 2009; RAVEN, 2001).

Além da importância dos polissacarídeos nas paredes celulares de plantas, existem diferentes tipos de ligações cruzadas entre eles nas matrizes da parede celular. Estas ligações incluem interações hidrofóbicas, ligações iônicas e covalentes (SILA et al., 2009). As ligações cruzadas entre os polissacarídeos parecem exercer funções importantes na planta durante o crescimento e desenvolvimento da parede celular, e apresenta um impacto distinto sobre as propriedades físicas e macromoleculares dos vegetais (SINGH et al., 2010; WALDRON et al., 2003).

As características estruturais gerais dos polissacarídeos que compõem a parede celular vegetal são altamente conservadas entre espécies. No entanto, o seu grau de substituição, a ramificação e integração na parede da célula pode ser diferente e tem um grande impacto nas propriedades do tecido (SALATO et al., 2013).

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. Entre 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 turgência; e proteção contra agressões físicas e químicas (PAIVA; LIMA; PAIXÃO, 2009).

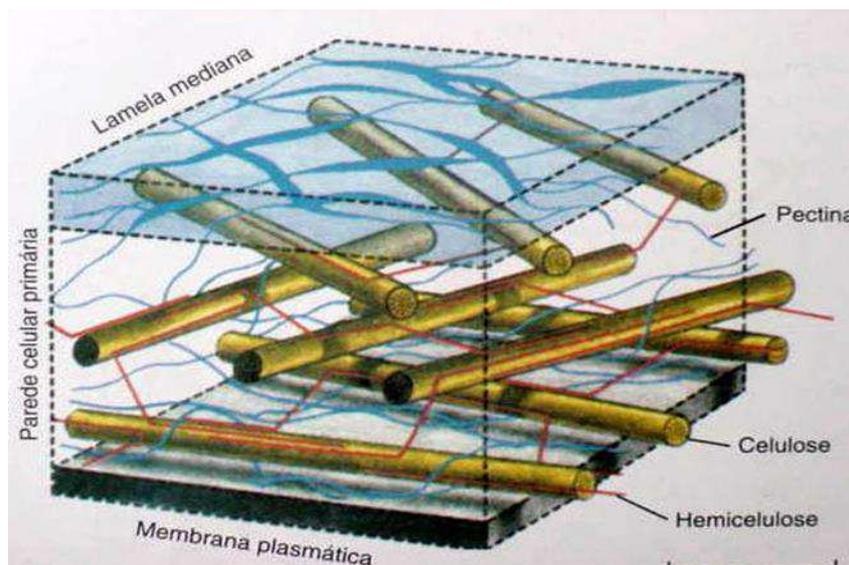


Figura 1 Estrutura da parede celular vegetal  
Fonte: International Pectin Producers Association - IPPA (2014)

## 2.4 Substâncias Pécicas

As pectinas são polissacarídeos estruturais encontrados na parede celular primária e nas camadas intercelulares de plantas terrestres. Elas estão associadas à celulose e hemicelulose na forma de protopectina, principalmente na parede celular primária e são encontradas em grande quantidade na lamela média sob a forma de ácido pectínico e pectato de cálcio (CANTERI et al., 2012). A protopectina, de natureza insolúvel, é facilmente hidrolisada por aquecimento, em meio ácido, formando pectina (MUNHOZ; SANJINEZ-ARGANDO; SOARES, 2010).

As substâncias pécticas constituem-se a classe de polissacarídeos da parede celular que sofrem a mais marcante modificação durante o amadurecimento dos frutos, com a solubilização e despolimerização associadas ao amolecimento dos frutos (OLIVEIRA, M. et al., 2006).

As pectinas contribuem para a adesão entre as células e para a resistência mecânica da parede celular. A sua quantidade e natureza são determinantes para a firmeza de frutos em geral durante o crescimento, amadurecimento, armazenamento e processamento (PINHEIRO, 2007).

Em tecidos jovens, especialmente em frutos, as pectinas estão presentes em grandes quantidades, nos espaços intercelulares, com excelente capacidade de absorção de água, sendo importante para os estádios iniciais de desenvolvimento dos tecidos vegetais (THAKUR; SINGH; HANDA, 1997).

A pectina é considerada como um dos biopolímeros mais complexos dos vegetais, embora os componentes individuais estejam bem caracterizados, a maneira como eles estão interligados estruturalmente dentro da parede celular ainda não é bem compreendido (POSÉ et al., 2012). A sua complexidade provavelmente está relacionada ao fato de ser um composto formado por dezessete diferentes monossacarídeos, organizados em polissacarídeos distintos, a partir de mais de vinte ligações diferentes (LIRA-ORTIZ et al., 2014).

As pectinas consistem principalmente de ácido D-galacturônico e açúcares neutros, tais como L-ramnose, L-arabinose, e D-galactose. São organizadas sob forma de cadeia constituída principalmente por resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligação glicosídica  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) formando uma estrutura linear (YAPO, 2011; ZHANG et al., 2015). Esta estrutura principal pode ser esporadicamente interrompida em locais com resíduos simples de  $\alpha$ -L-ramnose, que pode carregar cadeias laterais de resíduos de açúcares neutros, primariamente arabinanas e ou arabinogalactanas (CANTERI et al., 2012; MORRIS; FOSTER; HARDING, 2000). Os resíduos de ácido galacturônico podem ser parcialmente esterificados na posição C-6 com metanol, assim como os grupos hidroxilas nas posições C-2 ou C-3 podem estar parcialmente esterificados com ácido acético (BRANDÃO; ANDRADE, 1999; YADAV et al., 2009; YAPO, 2011). A estrutura geral da pectina está representada na Figura 2.

A pectina vem encontrando aplicações crescentes nas indústrias farmacêutica (presentes em medicamentos usados no tratamento de doenças gastroenterológicas, diabetes, hipertensão arterial, entre outras) e de biotecnologia. Ela vem sendo usada com sucesso por muitos anos nas indústrias alimentícias como agente espessante, gelificante e estabilizador coloidal (CHAN; CHOO, 2013; PANCHEV et al., 2010; SRIAMORNSAK, 2003).

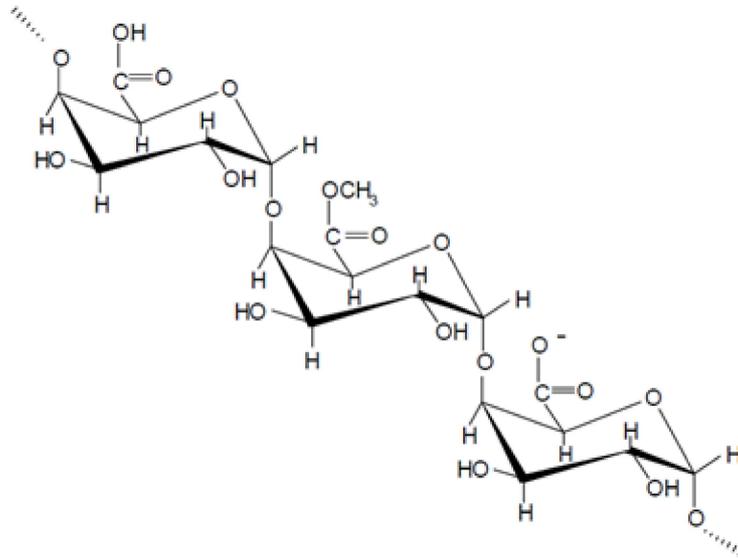


Figura 2 Estrutura química da cadeia de pectina  
 Fonte: Brandão e Andrade (1999)

## 2.5 Enzimas da parede celular

Uma característica comum entre frutos durante o amadurecimento é o incremento na atividade enzimática degradativa da parede celular, responsável pelo amaciamento. Do ponto de vista bioquímico, um grande número de enzimas tem participação na degradação biológica das substâncias pécicas (LINHARES et al., 2007).

A modificação dos polímeros da parede celular, durante o amadurecimento dos frutos, está relacionada com a ação coordenada de um número de enzimas como a poligalacturonase, pectato liase, pectinametilsterase, endo-(1,4)- $\beta$ -D-glicanase,  $\beta$ -xilosidase e endo-mananase (BRUMMELL; HARPSTER, 2001). A pectinametilsterase (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 (CHISARI et al., 2010; WEI et al., 2010).

A PME é amplamente distribuída em plantas, bactérias e fungos. A enzima catalisa a desmetoxilação da pectina, um dos principais polissacarídeos presentes na parede celular, que contribui para adesão celular, firmeza, elasticidade e integridade do tecido da planta. A PME modifica o grau e o padrão de metil esterificação das cadeias lineares de homogalacturonanas presentes nas pectinas e, por remodelar a estrutura da pectina, desempenha um papel chave no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da planta, além das interações planta-patógeno (JOLIE et al., 2010). A enzima PME remove grupos metil do ácido galacturônico, preparando o substrato para ação da PG. Assim, a PG somente catalisa a hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4 de ácido poligalacturônico, quando desesterificado (ALI; CHIN; LAZAN, 2004). Níveis decrescentes de esterificação são cruciais para o amaciamento dos frutos, o que faz com que a pectina se torne altamente susceptível à degradação por enzimas endógenas, facilitando a ação da PG (CHISARI et al., 2010).

Resultados de ensaios com tomates transgênicos têm sugerido que a PG por si só não é suficiente, nem necessária para o amadurecimento dos frutos, o que contradiz as informações disseminadas até então (WEI et al., 2010).

A atividade dessas duas enzimas (PME e PG) em goiaba, é bastante contraditória, havendo relatos tanto de aumento da atividade enzimática quanto diminuição e também ausência de PG. Linhares et al. (2007) observaram aumento da atividade de PME com o decorrer do amadurecimento nos frutos controle da goiaba cv. Pedro Sato, o mesmo observado por Xisto et al. (2004), 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. Em contrapartida, Lima (2004) detectou um decréscimo na atividade da PME durante o amadurecimento de frutos

colhidos em diferentes estádios de maturação. O mesmo acontece com a enzima PG, havendo relatos de aumento e também diminuição de atividade enzimática com o decorrer do amadurecimento de goiaba (LIMA, 2004; XISTO et al., 2004).

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  $\alpha$ -(1,4) de ácidos D-galacturônicos das substâncias pécnicas. As esterases catalisam a desesterificação da pectina pela remoção dos grupos metoxil éster (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

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 (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Outras hidrolases associadas à modificação da parede celular e ao amadurecimento de frutos incluem a  $\beta$ -galactosidase e as celulases (BENNETT; LABAVITCH, 2008). As celulases atuam degradando os polímeros de celulose da parede celular (KETSU; DAENGGANIT, 1999; MANRIQUE; LAJOLO, 2002). A celulase é uma endo-1,4- $\beta$ -glicanase que participa da degradação da celulose em glicose juntamente com a  $\beta$ -D-glicosidase (exo-1,4- $\beta$ -glicanase) ou

celobiohidrolase. A ação conjunta dessas enzimas contribui para a perda da firmeza da polpa de frutos por clivar as ligações  $\beta$ -(1,4)-D-glicosil que ocorrem nas microfibrilas de celulose e xiloglicanos (GALLON, 2010).

Segundo Pinto et al. (2011) devido a complexidade da estrutura da parede celular dos frutos, é improvável que uma enzima em particular, seja capaz de modificá-la significativamente e responder pelo amaciamento, provavelmente existem outras enzimas envolvidas.

## 2.6 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos ou polifenóis são derivados do metabolismo vegetal secundário presentes naturalmente em plantas e frutas. São parcialmente responsáveis pela cor, sabor, aroma e adstringência de muitos alimentos, além de estarem envolvidos no processo de crescimento e reprodução das plantas e caracterizarem propriedades antimicrobianas e inseticidas nas mesmas (SCHENKEL; CARVALHO; GOSMANN, 2007).

Os vegetais possuem vários compostos fenólicos, substâncias que apresentam radicais hidroxila ligados a um anel aromático, sendo agrupados em diferentes classes, de acordo com a sua estrutura química. Constituem a maior categoria de fitoquímicos em vegetais, são de grande interesse para a saúde humana, pois agem como antioxidantes naturais e também para a fisiologia pós-colheita, devido ao desenvolvimento da cor e do *flavor* nos frutos (ANGELIS, 2001; CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Nos frutos verdes, os compostos fenólicos, são encontrados nas formas monoméricas e dímeras (baixo peso molecular) e, nos frutos maduros, nas formas poliméricas (alto peso molecular). Durante o amadurecimento dos frutos, ocorre a condensação dos fenólicos solúveis, tornando-os insolúveis por se ligarem fortemente a outros compostos celulares, não sendo, portanto,

detectados pelas técnicas de extração (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Raramente os compostos fenólicos são encontrados na forma livre na natureza, podendo estar ligados a proteínas, lipídeos, terpenóides, ácido hidroxicinâmico, carboidratos e pode formar éster com ácidos orgânicos (KAYS, 1991).

A retenção dos compostos fenólicos na composição da parede celular dos vegetais depende de parâmetros estruturais, tais como estereoquímica, flexibilidade conformacional e peso molecular do composto fenólico. Além disso, características físicas da parede celular e composição química também pode influenciar a eventual ligação entre polissacarídeos da parede e as substâncias fenólicas (PINELO; RNOUNS; MEYER, 2006).

Os compostos fenólicos e os polissacarídeos da parede celular podem formar complexos e mecanismos de associação têm sido propostos para explicar a formação desse complexo: (1) Ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila dos fenóis e os átomos de oxigênio do éter da ligação cruzada de açúcares presentes nos polissacarídeos da parede celular. (2) Interações hidrofóbicas que ocorrem como resultado da capacidade de alguns polissacarídeos desenvolverem estruturas secundárias (PINELO; RNOUNS; MEYER, 2006). (3) Ligações ésteres cruzadas entre cadeias glicosídicas (TAIZ; ZEIGER, 2004). Porém, a medição dessas ligações cruzadas é difícil devido à falta de informação sobre a natureza de reticulação dos fenólicos na parede celular do vegetal, além do tipo e quantidade variar consideravelmente de um fruto para outro (BEVERIDGE; LOUBERT; HARRISON, 2000).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Procedência e colheita dos frutos**

As goiabas (*Psidium guajava* L.) da cv. Pedro Sato foram colhidas manualmente no início da manhã, em torno de 120 frutos, no estágio de maturação “de vez” (coloração verde claro) em um pomar comercial situado no município de Lavras, Minas Gerais, altitude 919 m, latitude 21,15° Sul, longitude 45,22° Oeste, e acondicionadas em caixas de polietileno previamente esterilizadas e transportadas ao Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras MG.

#### **3.2 Preparo dos frutos**

Foram selecionados 81 frutos em função do tamanho, cor e ausência de injúrias mecânicas e fisiológicas, lavados em água corrente e imersos em solução de hipoclorito de sódio a 1% temperatura ambiente por 5 minutos para desinfecção. Após secagem da solução de hipoclorito, os frutos foram numerados, colocados em uma estante no laboratório e mantidos por um período de oito dias à temperatura e umidade relativa (UR) de  $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $53\% \pm 1\%$ , respectivamente.

#### **3.3 Preparo da amostra**

As amostras foram preparadas para as análises no dia da colheita e a cada dia até o fim do período de amadurecimento. Para cada dia de análise foram retirados nove frutos (3 repetições de 3 frutos cada). Retirou-se o

endocarpo dos frutos e a polpa foi picada em pedaços de aproximadamente 1cm<sup>3</sup>. Esses pedaços foram homogeneizados, armazenados em potes plásticos e colocados no freezer (-20°C) para a posterior realização das análises.

### **3.4 Delineamento experimental**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo nove tratamentos (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 dias de amadurecimento). A parcela experimental foi composta de três frutos com três repetições para cada tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância por meio do software SANEST (ZONTA; MACHADO, 1991). Quando significativos, os dados foram submetidos à análise de regressão.

### **3.5 Análises físicas e químicas**

#### **3.5.1 Perda de massa**

As massas dos frutos foram obtidas utilizando-se balança analítica e a perda de massa determinada pela diferença, entre a massa inicial e a massa verificada para cada período de armazenamento. Os resultados da perda de massa foram expressos em porcentagem, considerando a massa do fruto no dia zero como 100%.

#### **3.5.2 Firmeza**

A firmeza foi determinada com penetrômetro digital (TA – XT2 i® texture analyzer), com ponteira plana com três mm de diâmetro, fazendo-se em

cada fruto duas leituras, equidistantes, na região equatorial do fruto. Os resultados foram expressos em Newton (N) (ABREU et al., 2012a).

### **3.5.3 Compostos Fenólicos**

A extração de compostos fenólicos foi realizada com 1 g de polpa de goiaba macerada, referente aos oito dias de amadurecimento, com três volumes consecutivos a 50 mL de metanol 50% sob refluxo a 80°C. Os extratos foram reunidos, evaporados até 25 mL e submetidos à dosagem de compostos fenólicos, utilizando-se o reagente de Folin-Denis, e como padrão o ácido tânico (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC, 2012).

#### **3.5.3.1 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos**

A análise cromatográfica foi realizada utilizando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo LC-20AT, um detector UV-visível modelo SPD-M20A, forno modelo CTO-20AC, interface modelo CBM-20<sup>a</sup> e injetor automático com autoamostrador modelo SIL-20<sup>a</sup>. As separações foram realizadas utilizando-se uma coluna Shim-pack VP-ODS-C18 (250 mm x 4,6 mm) conectada a uma pré-coluna Shim-pack Column Holder (10 mm x 4,6 mm).

A fase móvel foi composta pelas soluções de ácido acético em água (2:98 v/v) (A) e metanol: água: ácido acético (70: 28: 2 v/v/v) (B). As análises foram realizadas com tempo total de 65 minutos, temperatura de 40°C, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, comprimento de onda de 280 nm e volume de injeção de 20 µL em sistema do tipo gradiente (100% do solvente A de 0,01 a 5 minutos; 70% do solvente A de 5 a 25 minutos; 60% do solvente A de 25 a 43 minutos; 55% do

solvente A de 43 a 50 minutos e 0% do solvente A por 10 minutos) até o final da corrida. O solvente A foi aumentado para 100% buscando manter o equilíbrio da coluna.

Os padrões fenólicos utilizados foram ácido gálico, catequina, galato de epigalocatequina, epicatequina, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido salicílico, resveratrol, quercetina, cloreto de malvidina, cloreto de pelargonidina e cloreto de cianidina, obtidos da empresa Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). As soluções estoques dos padrões foram preparadas em metanol (grau HPLC/Sigma-Aldrich®) em intervalos de concentração, sendo respectivamente: para o ácido gálico (0,075 - 7,5252 mg L<sup>-1</sup>), catequina (0,116 - 11,6120 mg L<sup>-1</sup>), galato de epigalocatequina (0,1837 - 18,3360 mg L<sup>-1</sup>), epicatequina (0,1161 - 11,6108 mg L<sup>-1</sup>), ácido siríngico (0,0793 - 7,9268 mg L<sup>-1</sup>), ácido p-cumárico (0,0657 - 6,5664 mg L<sup>-1</sup>), ácido ferúlico (0,0777 - 7,7672 mg L<sup>-1</sup>), ácido salicílico (0,0552 - 5,5248 mg L<sup>-1</sup>), resveratrol (0,0913 - 9,1296 mg L<sup>-1</sup>), quercetina (0,0004 - 0,0400 mg L<sup>-1</sup>), cloreto de malvidina (0,1467 - 14,6700 mg L<sup>-1</sup>), cloreto de pelargonidina (0,1227 - 12,2680 mg L<sup>-1</sup>) e cloreto de cianidina (0,1291 - 12,908 mg L<sup>-1</sup>). O ácido acético e metanol (grau HPLC/Sigma-Aldrich®) foram usados na preparação da fase móvel.

O extrato de goiaba e os padrões foram filtrados em uma membrana de nylon de 0,45 µm (Millipore®) e diretamente injetados no sistema cromatográfico, com três repetições. Os compostos fenólicos no extrato foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões. A quantificação foi realizada por meio da construção de curvas analíticas obtidas por regressão linear, empregando-se o pacote computacional Origin 6.1, considerando o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) de 0,99 (ORIGIN LAB CORPORATION, 2000).

### **3.6 Extração de pectinas**

### **3.6.1 Pectina para análise de Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR)**

Pesou-se 2 g de goiaba (2 g de polpa de goiaba pura foi macerada previamente, sem adição de solventes, com auxílio de almofariz e pistilo) e adicionou-se 20 mL de álcool etílico 95%. Após repouso de uma noite, as amostras foram submetidas à agitação (agitador mecânico a 60 rpm e temperatura ambiente) por uma hora. Após a agitação, as amostras foram centrifugadas a 5000 x g por 10 minutos. O sobrenadante (denominado de SOB) foi descartado e ao sedimento (denominado de SED1) foi adicionado 20 mL de água, deixou-se agitar por uma hora e filtrou-se em papel de filtro, lavou-se o mesmo com duas porções de 2,5 mL de água. O filtrado foi denominado como pectina solúvel. O resíduo foi homogeneizado em 20 mL de tampão citrato fosfato 0,1mol L<sup>-1</sup> pH 4,8 com adição de 20 mg de celulase (Sigma Aldrich; 0,8U mg<sup>-1</sup>) e 20 mg de hemicelulase (Sigma Aldrich; 0,3 – 3U mg<sup>-1</sup>). Essas amostras ficaram sob agitação por uma noite a temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas a 5000 x g por 10 minutos. O SED2 foi denominado como pectina insolúvel.

Repetiu-se o mesmo procedimento descrito acima, porém o resíduo foi homogeneizado em 20 mL de tampão citrato fosfato 0,1mol L<sup>-1</sup> pH 4,8 com adição de 20 mg de celulase, 20 mg de hemicelulase e 20 mg de pectinase (Sigma Aldrich; 1,02U mg<sup>-1</sup>) e procedeu-se da mesma maneira.

A caracterização da pectina solúvel e insolúvel pela espectroscopia de absorção na região do infravermelho foi realizada no Centro de Análise e Prospecção Química do DQI/UFLA, utilizando-se a técnica de pastilha com 198 mg de brometo de potássio (KBr) e 2 mg da fração de pectina, que foi liofilizada; em seguida, foram prensadas (50N/sqin) e analisadas em

espectrômetro FTS 3000 Excalibur Digilab, com transformata de Fourier (resolução  $4\text{ cm}^{-1}$  e 64 scans), sendo os espectros registrados na faixa de  $4.400$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ .

### 3.6.2 Pectina total e solúvel

As pectinas totais e solúveis foram extraídas segundo a técnica padronizada por McCready e McCoomb (1952). Para a determinação da pectina total pesou-se 1 g de amostra (1 g de polpa de goiaba pura foi macerada previamente, sem adição de solventes, com auxílio de almofariz e pistilo) e adicionou-se 10 mL de álcool etílico 95%. Após repouso de uma noite, as amostras foram submetidas à agitação (agitador mecânico a 60 rpm e temperatura ambiente) por uma hora. Após a agitação, filtrou-se em papel de filtro, e lavou-se o mesmo com duas porções de 5 mL de álcool etílico 95%. Ao resíduo do papel de filtro, foi adicionado 10 mL de solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)  $0,11\text{ mol L}^{-1}$ , pH 11. Após 30 minutos o pH foi ajustado para 5 com ácido acético 10% e foram adicionados 50 mg de pectinase (Sigma Aldrich;  $1,02\text{U mg}^{-1}$ ) à amostra e após uma hora de agitação, procedeu-se a filtração e completou-se o volume do filtrado para 20 mL com solução de EDTA. Obteve-se assim a pectina total que depois de quantificada, teve seu valor subtraído em relação à pectina solúvel, obtendo-se assim o teor de pectina insolúvel.

Para determinação da pectina solúvel foram realizados os mesmos procedimentos executados no item supracitado. Porém, ao resíduo do papel de filtro, adicionou-se 10 mL de água destilada e, após uma hora de agitação, procedeu-se a filtração e lavou-se o resíduo com 10 mL de água destilada. O filtrado foi armazenado em freezer.

Para quantificação das substâncias pécticas, utilizou-se a técnica padronizada de Bitter e Muir (1962). Para ambas as pectinas a reação se processou da seguinte forma: 1 mL de extrato diluído foram adicionados 3 mL da solução de tetraborato de sódio em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado com os tubos mergulhados em banho de gelo, agitando-se vigorosamente os tubos e colocando-se em água fervente por 10 minutos. Após, resfriamento dos tubos, adicionou-se 0,1 mL de carbazol, agitando-se e colocando-se em água fervente por mais 15 minutos. A cor desenvolvida foi lida após 30 minutos em espectrofotômetro a 530 nm e os resultados foram expressos em g de ácido galacturônico por 100 g de polpa de goiaba.

### **3.6.3 Pectina com celulase em tampão citrato fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 4,8**

Pesou-se 1 g de goiaba macerada e adicionou-se 10 mL de álcool etílico 95%. Após repouso de uma noite, as amostras foram submetidas à agitação (agitador mecânico a 60 rpm e temperatura ambiente) por uma hora. Após a agitação, filtrou-se em papel de filtro, e lavou-se o mesmo com duas porções de 5 mL de álcool etílico 95%. Ao resíduo do papel de filtro, adicionou-se 10 mL de água e deixou-se agitar por uma hora. Em seguida, filtrou-se e lavou-se com 10 mL de água. O filtrado foi denominado de pectina solúvel. Ao resíduo da pectina solúvel foi adicionado celulase (5 mg mL<sup>-1</sup>) em 20 mL de tampão citrato fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 4,8. Esse homogeneizado ficou em repouso por uma noite em banho-maria a 30°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 5000 x g por 10 minutos a 25°C. Ao sobrenadante foi adicionado 50 mg de pectinase, deixando-se agitar por 30 minutos a 30°C, obteve-se a pectina insolúvel na fração sobrenadante. Ao sedimento adicionou-se 10 mL de solução de EDTA 0,11 mol L<sup>-1</sup>, pH 11. Após 30 minutos o pH foi ajustado para 5 com ácido acético 10% e foram adicionados 50 mg de pectinase. Agitou-se por uma

hora a 30°C e completou-se o volume para 20 mL de EDTA, obteve-se a pectina insolúvel na fração sedimento. Essas substâncias pécticas foram quantificadas pela técnica padronizada de Bitter e Muir (1962).

### **3.6.4 Pectina com celulase e hemicelulase em tampão citrato fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 4,8**

Foram realizados os mesmos procedimentos executados no item supracitado. Porém, ao resíduo da pectina solúvel adicionou-se celulase (5 mg mL<sup>-1</sup>) e hemicelulase (5 mg mL<sup>-1</sup>) em 20 mL de tampão citrato fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 4,8 e prosseguiu a análise da mesma maneira.

## **3.7 Análises Enzimáticas**

### **3.7.1 β-D-glicosidase com salicina**

A extração da enzima foi feita a partir de 5 g de polpa de goiaba triturada com auxílio de almofariz e pistilo as quais adicionaram-se 20 mL de água destilada gelada. Homogeneizou-se em politron e centrifugou-se a 10000 x g por 10 minutos a 4°C. Mediu-se o volume do sobrenadante e o sedimento foi ressuspendido em 20 mL de água destilada, homogeneizando-se novamente em politron. O sobrenadante e o sedimento foram utilizados como extrato enzimático.

A mistura da reação consistiu de 0,1 mL do extrato enzimático e 0,1 mL do substrato salicina 0,01 mol L<sup>-1</sup> em tampão citrato fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 5,5. Após o período de incubação a 30°C, por quatro intervalos de tempo (10, 20, 30 e 40 minutos), a reação foi interrompida com 0,2 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) conforme o método proposto por Noeltling e Bernfeld

(1948). A quantidade de glicose liberada foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm. Simultaneamente, foram preparados brancos, substituindo-se o substrato por seu respectivo solvente (branco de enzima), a enzima por seu respectivo solvente (branco de substrato). Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de um micromol de glicose por minuto nas condições de ensaio. Os resultados foram expressos em miliunidades (mU) por g de polpa de goiaba.

### 3.7.2 $\beta$ -D-glicosidase com pNP $\beta$ G

A extração da enzima foi realizada a partir de 5 g de polpa de goiaba triturada com auxílio de almofariz e pistilo as quais adicionaram-se 20 mL de água destilada gelada. Homogeneizou-se em politron e centrifugou-se a 10000 x g por 10 minutos a 4°C. Mediu-se o volume do sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 20 mL de água destilada, homogeneizando-se novamente em politron. O sobrenadante e o sedimento foram utilizados como extrato enzimático.

A mistura da reação consistiu de 0,1 mL do extrato enzimático e 0,1 mL do substrato p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (pNP $\beta$ G) 0,01 mol L<sup>-1</sup> em tampão citrato fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 5,5. Após o período de incubação a 30°C, por quatro intervalos de tempo (10, 20, 30 e 40 minutos), a reação foi interrompida com 1 mL de NaOH 0,05 mol L<sup>-1</sup>. Controles de branco de enzima e branco de substrato foram realizados da mesma forma que o ensaio. A quantidade de p-nitrofenol liberado foi determinada em espectrofotômetro a 410 nm. A atividade de  $\beta$ -D-glicosidase foi expressa em miliunidades (mU) que corresponde à formação de um nanomol de p-nitrofenol por minuto nas condições de ensaio (LINHARES et al., 2007).

### 3.7.3 Esterase

#### 3.7.3.1 Extração

A extração de esterase da polpa de goiaba 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 (HOM) foi centrifugado a  $10000 \times g$  por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$  e o sobrenadante (SOB1) constituiu o extrato de esterase solúvel. O sedimento (SED1) 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  $4^\circ\text{C}$  com agitações eventuais, o homogeneizado foi centrifugado a  $10000 \times g$  por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$  e o sobrenadante (SOB2) foi utilizado como esterase solubilizada. O sedimento 2 (SED2) foi utilizado como esterase não solubilizada.

#### 3.7.3.2 Determinação da atividade da esterase utilizando $\alpha$ -naftilacetato e *Fast Blue RR Salt*

A atividade da esterase foi determinada segundo Linhares et al. (2007), utilizando-se como meio reacional 0,1 mL do extrato enzimático em todas as frações extraídas (HOM, SOB1, SED1, SOB2, SED2) e 0,1 mL do substrato  $\alpha$ -naftilacetato  $4,46 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,22 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,5. A incubação foi realizada a  $30^\circ\text{C}$ , por quatro intervalos de tempo (10, 20, 30 e 40 minutos), e a reação foi interrompida após cada tempo com 1 mL de reagente de cor. Esse reagente foi preparado dissolvendo-se 10 g de ácido cítrico em 50 mL de água e o pH ajustado para 6,0 com NaOH  $13 \text{ mol L}^{-1}$ . Foi adicionado 1g de SDS e 0,058g de *Fast Blue RR Salt*, e completou-se o volume para 100 mL. A quantidade de  $\alpha$ -naftol liberado foi determinada em espectrofotômetro a 500 nm.

Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de um micromol de  $\alpha$ -naftol por minuto nas condições de ensaio. Os resultados foram expressos em miliunidades (mU) por g de polpa fresca.

### **3.7.3.3 Determinação da atividade de esterase utilizando $\alpha$ -naftilacetato leitura espectrofotométrica a 322 nm**

A atividade esterásica foi determinada segundo Morgan et al. (1994), utilizando-se 0,1 mL do extrato enzimático em todas as frações extraídas (HOM, SOB1, SED1, SOB2, SED2) e 0,1 mL do substrato  $\alpha$ -naftilacetato 4,46 mmol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,22 mol L<sup>-1</sup> pH 6,5. A incubação foi realizada a 30°C, por quatro intervalos de tempo (90, 180, 270 e 360 minutos). Em seguida, o ensaio foi submetido a banho de gelo e adicionado ao meio reacional 1 mL de água. A absorbância do  $\alpha$ -naftol foi determinada espectrofotometricamente a 322 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de um micromol de  $\alpha$ -naftol por minuto nas condições de ensaio. Os resultados foram expressos em miliunidades (mU) por g de polpa fresca.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Perda de massa dos frutos

A perda de massa ao fim dos oito dias de armazenamento foi de 19,9% (Figura 3). Segundo Chitarra e Chitarra (2005), uma perda de massa de até 15% não prejudica a aparência do fruto. Neste caso, verificou-se que a perda de massa prejudicou a aparência dos frutos no final dos oito dias de armazenamento, já que os frutos apresentavam coloração amarelada e uma menor textura crocante, além de estarem amolecidos (Figura 4), tornando-se inviável o uso dos mesmos para o comércio da fruta fresca.

Ao observar a Figura 3, conclui-se que no quinto dia de amadurecimento, os frutos apresentaram uma perda de massa de aproximadamente 15%. A perda de massa depende principalmente das condições de armazenamento que, nesse caso estava em temperatura alta ( $\pm 27^{\circ}\text{C}$ ) e umidade relativa (UR) baixa ( $\pm 53\%$ ). 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, sabor e textura. Sendo assim, a perda de massa é uma variável importante, que está diretamente relacionada com a qualidade do fruto (AZZOLINI; JACOMINO; BRON, 2004). Os valores aceitáveis de perda de massa fresca para diferentes cultivares encontram-se entre 10 e 15% (XISTO, 2002); portanto, pode-se afirmar que os resultados deste estudo estão acima da faixa considerada satisfatória.

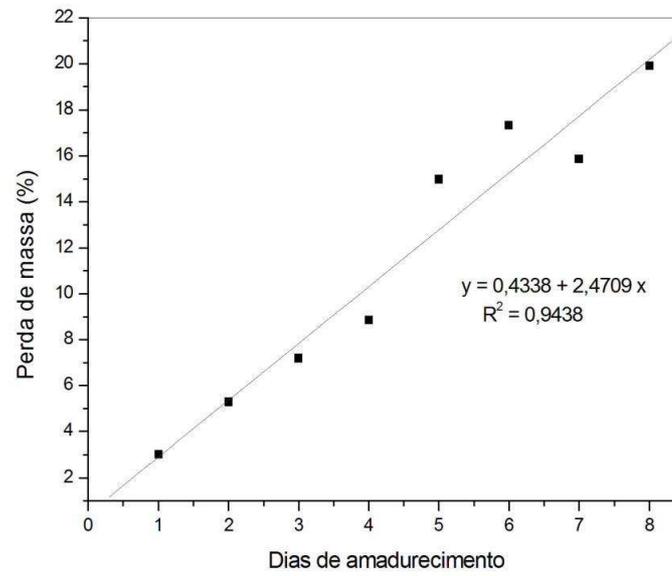


Figura 3 Porcentagem de perda de massa de goiabas cv. Pedro Sato armazenadas sob condições ambientais



Figura 4 Alterações ocorridas em goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de armazenamento em temperatura ambiente

A perda de massa em goiabas, armazenadas à temperatura ambiente, varia em decorrência das condições experimentais utilizadas. Batista et al. (2009) verificaram uma perda de 15,46% de massa fresca em goiabas cv. Paluma após doze dias de armazenamento com médias de temperatura e UR de  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e 72%, respectivamente. Para a cv. Kumagai durante oito dias de armazenamento sob condição ambiente ( $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $85 \pm 5\% \text{UR}$ ) foi verificado uma perda de 8,68% (MORGADO et al., 2010).

Jacomino et al. (2003) observaram uma perda de massa de 8,41% na cv. Pedro Sato após o sexto dia de armazenamento em condição ambiente ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75 \pm 5\% \text{UR}$ ), Linhares et al. (2007) estudando a mesma cultivar, no mesmo período de armazenamento, porém em condições ambientais de ( $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$  e  $84 \pm 6\% \text{UR}$ ) verificaram uma perda de 11,39% de massa. Para este experimento,

detectou-se 17,33% de perda de massa no referido dia. Essa alta porcentagem apresentada pelos frutos, pode ser explicada pela perda de água decorrente das taxas de transpiração, devido à alta temperatura e baixa umidade relativa ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $53 \pm 1\%$  UR) durante a análise. A temperatura e a umidade relativa são os principais fatores a alterar a taxa de transpiração dos frutos, cuja magnitude pode depender da senescência e da deterioração do fruto (PEREIRA et al., 2005).

#### **4.2 Firmeza**

A alteração da cor e a perda de firmeza dos frutos representam as mudanças mais importantes que ocorrem no decorrer do processo de maturação (PINTO et al., 2010).

A diminuição da firmeza de goiabas cv. Pedro Sato, durante o amadurecimento à temperatura ambiente, é mais bem explicada por uma equação quadrática (Figura 5), devendo ressaltar que no dia da colheita (frutos “de vez” casca verde claro) a firmeza foi de 28,6N e diminuiu acentuadamente até o 4º dia de amadurecimento (4,54N redução de 84%), com os frutos já macios. Com base nesse resultado, verificou-se que a temperatura e UR desempenham um papel importante no metabolismo dos frutos, pois devido à alta temperatura e baixa umidade ( $27^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  e  $53\% \pm 1\%$ ), os frutos apresentaram-se menos firmes, provavelmente devido ao aumento da atividade respiratória, aumento da perda de massa e da produção de etileno pelas frutas.

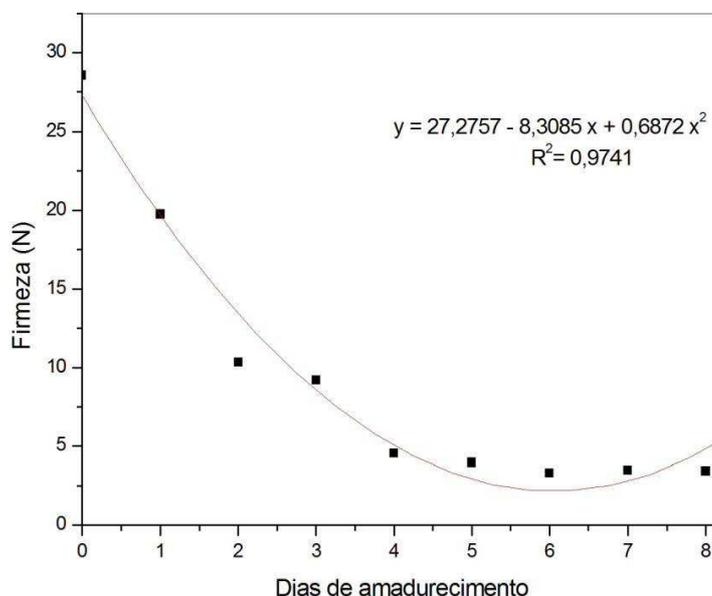


Figura 5 Curva e equação de regressão representativa dos valores de firmeza de goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de armazenamento, sob condições ambientais

Pesquisadores que analisaram a firmeza de goiabas cv. Pedro Sato durante o amadurecimento à temperatura ambiente apresentaram resultados semelhantes. Vieira et al. (2008) encontraram uma redução de 89% na firmeza, em condições ambientais (22°C e 89% UR), enquanto Abreu et al. (2012a) analisaram uma perda de 73% de firmeza durante quatro dias de armazenamento em temperatura  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR  $78 \pm 1\%$ . Alguns resultados apresentados na literatura para outras cultivares foram semelhantes, com variação de 85% em goiabas cv. Paluma (CAVALINI et al., 2006), 78% em goiabas cv. Cortibel (WERNER et al., 2009) e 83% em goiabas cv. Allahabad Safeda (SINGH; PAL, 2008). Porém outros resultados foram diferentes, Mercado-Silva, Bautista e Garcia-Velasco (1998) encontraram uma perda de 34% na firmeza de goiabas

cv. Média China entre 3<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dia de amadurecimento, já a cv. Kumagai mostrou-se variações de 36% entre o dia da colheita até o décimo dia de amadurecimento (VIEIRA et al., 2014). Deve-se ressaltar que a cv. Kumagai é considerada como de longa vida de prateleira.

As modificações nas pectinas da parede celular primária e suas interações têm sido associadas como as principais causas para mudanças de textura, que resultam em uma diminuição da firmeza durante o amadurecimento do fruto (BRUMMELL, 2006; GOULAO, 2010).

A perda de firmeza durante o amadurecimento é devido à atividade de enzimas hidrolíticas que promovem intensa solubilização das pectinas constituintes da parede celular, principalmente a atividade de pectinametilesterases (PME) e poligalacturonases (PG) (JAIN et al., 2001; OLIVEIRA, M. et al., 2006), porém Linhares et al. (2007) não verificaram atividade da PG em goiaba cv. Pedro Sato, assim a explicação para diminuição da firmeza continua ainda desconhecida.

Em razão da complexidade da estrutura da parede celular, é improvável que uma enzima, em particular, seja capaz de modificá-la significativamente e responder pelo amaciamento (ALI; CHIN; LAZAN, 2004), entretanto ações coletivas e sinérgica de várias enzimas seriam necessárias para promover mudanças texturais relevantes (PINTO et al., 2011).

### **4.3 Compostos Fenólicos**

O comportamento dos compostos fenólicos em goiabas cv. Pedro Sato, durante amadurecimento à temperatura ambiente está representado na Figura 6. A variação de fenólicos totais para o fruto verde (dia 0) e maduro (dia 8) foi respectivamente; 259,8 e 328,2 mg de ácido tânico por 100 g de polpa fresca. Houve um aumento de 26,3% no teor de fenólicos no período de

amadurecimento. O aumento no teor de compostos fenólicos na pós-colheita muitas vezes pode ser relacionado a estresses bióticos e abióticos, que induzem o metabolismo secundário do fruto, com aumento na produção desses compostos (SEVERO et al., 2010). Pode-se também relacionar esse aumento dos compostos fenólicos a liberação deles com a degradação da parede celular. Os fenólicos ligados nos polissacarídeos de parede são liberados, podendo ser detectados pela técnica de extração.

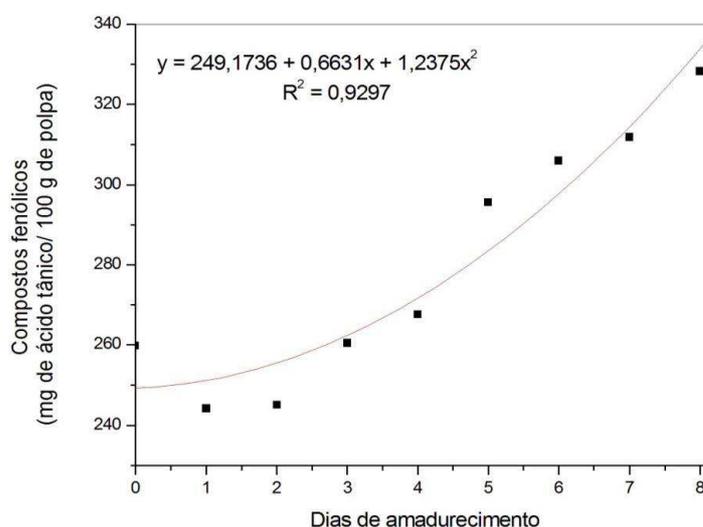


Figura 6 Análise de regressão representativa dos valores de compostos fenólicos em goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de armazenamento, sob condições ambientais

Os resultados obtidos não são coincidentes com os encontrados por Morgado et al. (2010) que analisaram um teor médio de  $73,6 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  de polpa de goiaba cv. Kumagai. Lim, Lim e Tee (2007) e Oliveira et al. (2011) analisando goiabas cv. Paluma encontraram teores semelhantes de  $150 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ , ao passo que Kuskoski et al. (2006) verificaram um teor de  $83 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ . Para cv. Allahabad Safeda que tem polpa branca foi encontrado  $344,90 \text{ mg } 100$

$\text{g}^{-1}$  (THAIPONG et al., 2006). No endocarpo de goiabas cv. Pedro Sato durante o amadurecimento houve um decréscimo nos teores de polifenóis até o quarto dia de maturação, e um pequeno aumento a partir desse estágio (LINHARES, 2005).

As discrepâncias existentes na literatura, nos teores de compostos fenólicos, podem ser influenciadas por diversos fatores, tais como: maturação, cultivares, práticas de cultivo, origem geográfica, estágio de crescimento, condições de colheita e processo de armazenamento dos frutos (SOARES et al., 2008).

Os compostos fenólicos são parcialmente responsáveis pela cor, sabor, aroma e adstringência de muitos alimentos (SCHENKEL; CARVALHO; GOSMANN, 2007), e há evidências na literatura que os polímeros de pectina, considerados os principais responsáveis pela firmeza dos frutos verdes e maduros, podem apresentar suas cadeias glicosídicas interligadas entre si por compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Parr et al. (1997) analisaram que os compostos fenólicos da parede celular poderiam influenciar as propriedades físicas do tecido da cenoura. Ao passo que Hutzler et al. (1998), Le Bourvellec et al. (2005) e Markham et al. (2001), relataram que as ligações entre os fenóis e os polissacarídeos da parede celular de maçã poderiam estar associadas através de diferentes ligações químicas ou natureza física, dependendo da composição e disposição dos fenóis e polissacarídeos. Já Tsai et al. (2010) destacaram a interação entre os compostos fenólicos e a pectina na manutenção da textura da goiaba durante o processamento térmico.

Para investigar as alterações ocorridas nas pectinas da parede celular de goiabas durante o seu amadurecimento, a análise de identificação de compostos fenólicos por HPLC foi realizada. O objetivo era verificar se os compostos fenólicos sofrem modificações durante o amadurecimento e se essas alterações

estão relacionadas com a liberação dos polímeros de pectina, sendo responsáveis pela diminuição de firmeza dos frutos.

Os cromatogramas dos padrões utilizados estão apresentados na Figura 7. Os compostos fenólicos identificados da polpa de goiaba, durante oito dias de amadurecimento, foram: ácido gálico, catequina e galato de epigalocatequina. Verificou-se ainda a presença de outros picos, porém as substâncias não foram identificadas. Dois picos que despertaram a atenção foram em aproximadamente 48 e 53 minutos. Esses picos aumentaram com o decorrer do amadurecimento, porém os fenólicos não foram identificados (Figura 8). O aumento desses dois picos não identificados caracteriza que esses fenólicos estão interligados as cadeias de pectinas e, podem estar contribuindo juntamente com as pectinas, pela integridade da parede celular.

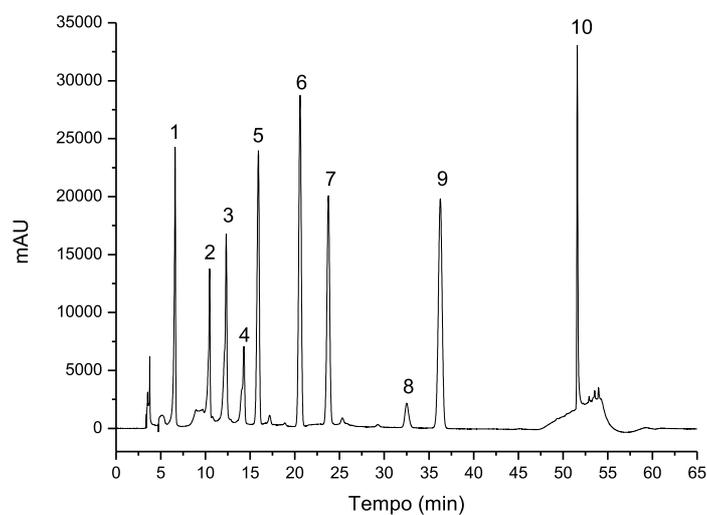


Figura 7 Cromatograma dos padrões utilizados. Identificação dos picos: 1- ácido gálico (tempo = 6,599); 2- catequina (tempo = 10,459); 3- galato de epigalocatequina (tempo = 12,314); 4- epicatequina (tempo = 14,290); 5- ácido siríngico (tempo = 15,912); 6- ácido p- cumárico (tempo = 20,578); 7- ácido ferúlico (tempo = 23,744); 8- ácido salicílico (tempo = 32,498); 9- resveratrol (tempo = 36,266); 10- quercetina (tempo = 51,589)

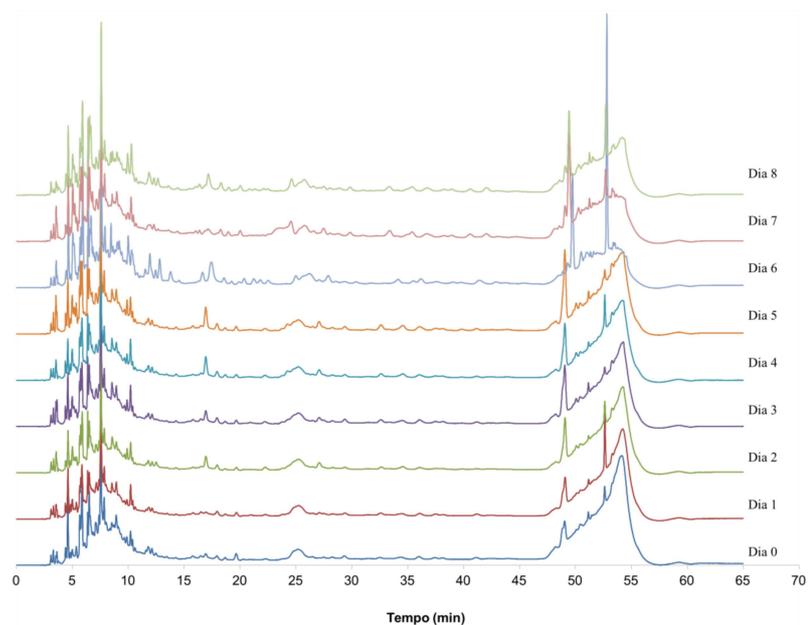


Figura 8 Cromatograma do extrato da polpa de goiaba durante oito dias de amadurecimento. Tempos de retenção médios dos compostos fenólicos identificados: ácido gálico (tempo =  $6,515 \pm 0,016$ ); catequina (tempo =  $10,408 \pm 0,036$ ); galato de epigalocatequina (tempo =  $12,164 \pm 0,073$ )

O ácido gálico é considerado um tanino hidrolisável, enquanto a catequina e o galato de epigalocatequina quando encontrados sob a forma oligômeros e polímeros, formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavanoídicas, são considerados taninos condensados. Estes compostos apresentam fortes interações com íons metálicos e macromoléculas como os polissacarídeos, além de apresentar habilidade para formar complexos solúveis com diversas outras proteínas (SIMÕES et al., 2007). As estruturas dos compostos fenólicos identificados estão apresentadas na Figura 9.

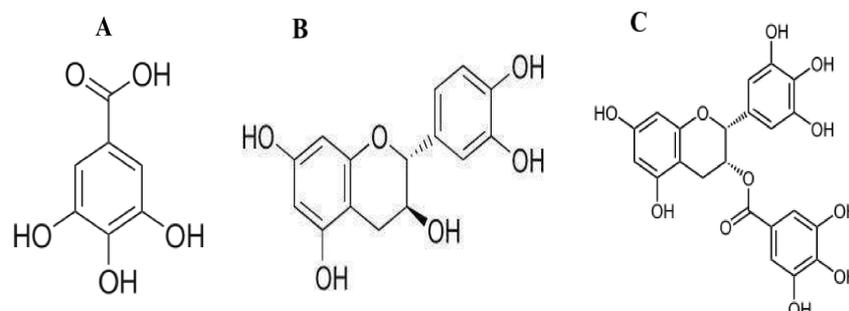


Figura 9 Estruturas dos compostos fenólicos identificados: (A) ácido gálico. (B) catequina. (C) galato de epigalocatequina

A concentração do ácido gálico para o fruto verde (dia 0) e maduro (dia 8) foi de 1,23 e 0,97 mg 100 g<sup>-1</sup> de polpa fresca, respectivamente. A catequina variou de 1,21 a 0,88 mg 100 g<sup>-1</sup>, enquanto o galato de epigalocatequina apresentou um pequeno aumento de 1,52 para 2,01 mg 100 g<sup>-1</sup> (Tabela 1).

Tabela 1 Concentração dos compostos fenólicos: ácido gálico, catequina e galato de epigalocatequina em goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de armazenamento

Compostos fenólicos (mg 100 g <sup>-1</sup> )*			
Dias	Ácido gálico	Catequina	Galato de epigalocatequina
0	1,23 ± 0,02	1,21 ± 0,08	1,52 ± 0,03
1	0,89 ± 0,01	1,73 ± 0,01	1,50 ± 0,02
2	0,88 ± 0,01	1,27 ± 0,02	1,66 ± 0,01
3	0,90 ± 0,00	1,85 ± 0,01	1,86 ± 0,01
4	0,84 ± 0,03	1,49 ± 0,01	1,83 ± 0,01
5	0,94 ± 0,01	1,78 ± 0,01	1,79 ± 0,01
6	0,92 ± 0,00	1,45 ± 0,01	2,34 ± 0,02
7	1,15 ± 0,01	1,75 ± 0,01	1,79 ± 0,01
8	0,97 ± 0,02	0,88 ± 0,02	2,01 ± 0,02

\*Os dados são as médias de triplicatas ± desvio-padrão.

Não há registro de caracterização de compostos fenólicos em polpa de goiaba durante o seu amadurecimento, porém, existem trabalhos que relatam esses compostos em folhas de goiabeira. Nantitanon et al. (2010) identificaram os fenólicos ácido gálico, ácido elágico e quercetina em diferentes concentrações dependendo do estágio da folha e do tipo de solvente utilizado na extração. Resultados semelhantes foram encontrados por Hsieh et al. (2007) e Wu et al. (2009) que identificaram ácido gálico e quercetina. Já Melo et al. (2011) relataram a presença dos fenólicos: ácido gálico, epicatequina, quercetina, ácido isovanílico, ácido p-cumárico, ácido cafeico e resveratrol nos extratos etanólicos de bagaços de goiaba.

A presença dos compostos fenólicos encontrados nesse estudo mostrou que dois desses que não foram identificados por HPLC, participam da parede celular de goiaba, pois os mesmos tiveram seus teores aumentados durante os dias de amadurecimento. Já os fenólicos identificados mantiveram-se os seus teores constantes durante o amadurecimento (Tabela 1).

#### **4.4 Análises Espectroscópicas na Região do Infravermelho**

Abreu et al. (2012a) observaram uma característica muito interessante, que era a migração gradativa da pectina da parede celular e consequente acúmulo no interior da célula (talvez em vacúolos) durante o amadurecimento da goiaba. Devido a esse comportamento curioso e peculiar, foram feitas análises de infravermelho na fração da pectina solúvel, pectina insolúvel utilizando as enzimas celulase e hemicelulase e pectina insolúvel com as enzimas celulase, hemicelulase e pectinase durante oito dias de amadurecimento, com a finalidade de identificar possíveis mudanças ocorridas na estrutura da pectina.

Os espectros, padrão do ácido poligalacturônico e pectina comercial (Figura 10), foram apresentados para mostrar as semelhanças de grupos funcionais com os espectros de pectinas analisados neste trabalho.

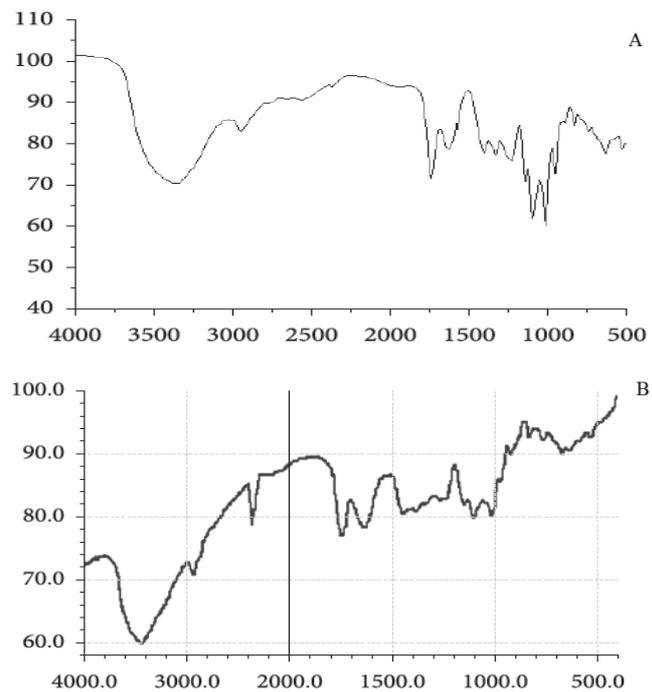


Figura 10 Caracterização espectroscópica FT-IR das substâncias pécicas. (A) padrão ácido galacturônico. (B) pectina comercial  
Fonte: Abreu et al. (2012b)

No espectro de infravermelho da pectina solúvel (Figura 11) pode-se observar bandas de absorção em  $3650-3000\text{ cm}^{-1}$  referente às características de estiramento de OH das unidades de pectina e vibração de deformação axial de hidroxila livre e água. Em  $2927\text{ cm}^{-1}$ , ocorre a vibração de deformação axial de C-H (SILVERSTEIN, 1974).

A região entre 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$  é de especial interesse no que diz respeito à avaliação do grau de esterificação, uma vez que permite observar a absorção dos grupos ácido carboxílico e éster carboxílico das moléculas de pectina (STEWART; MORISSON, 1992). Essa região também é importante para verificar a presença de interferentes, principalmente fenólicos e proteínas (CHATJIGAKIS et al., 1998). A banda em 1745  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à absorção das carboxilas esterificadas das moléculas de pectina, enquanto a banda em aproximadamente 1618  $\text{cm}^{-1}$  se refere às carboxilas livres (MONSOOR; KALAPATHY; PROCTOR, 2001). Pelo espectro (Figura 11) observa-se a ausência da banda 1745  $\text{cm}^{-1}$  nos dias zero e um e o seu aparecimento a partir do segundo dia, assim pode-se inferir que as pectinas apresentam cadeias esterificadas após o segundo dia de amadurecimento. Já Chatjigakis et al. (1998) verificaram uma diminuição do grau de esterificação de pectinas da parede celular de pêsego durante o seu amadurecimento. Observaram uma diminuição na intensidade da banda em 1749  $\text{cm}^{-1}$ , referente aos grupos carboxílicos esterificados, e um aumento da intensidade da banda em 1630  $\text{cm}^{-1}$ , referente às carboxilas livres.

A região entre 1440-1390  $\text{cm}^{-1}$  é característica da vibração de deformação angular de O-H acoplada com as vibrações de C-H. A banda em 1150  $\text{cm}^{-1}$  indica a presença de função éter, referente à vibração axial assimétrica C-O-C e a deformação axial de C-O ocorrendo em 1105-1016  $\text{cm}^{-1}$ . (SILVERSTEIN, 1974).

A região entre 1200-800  $\text{cm}^{-1}$  é considerada como a região de “impressão digital” para carboidratos. É originada pela interação complexa dos modos de vibração, e como consequência, é completamente impossível atribuir uma banda da região a uma vibração de um grupo de átomo específico (MANRIQUE; LAJOLO, 2002).

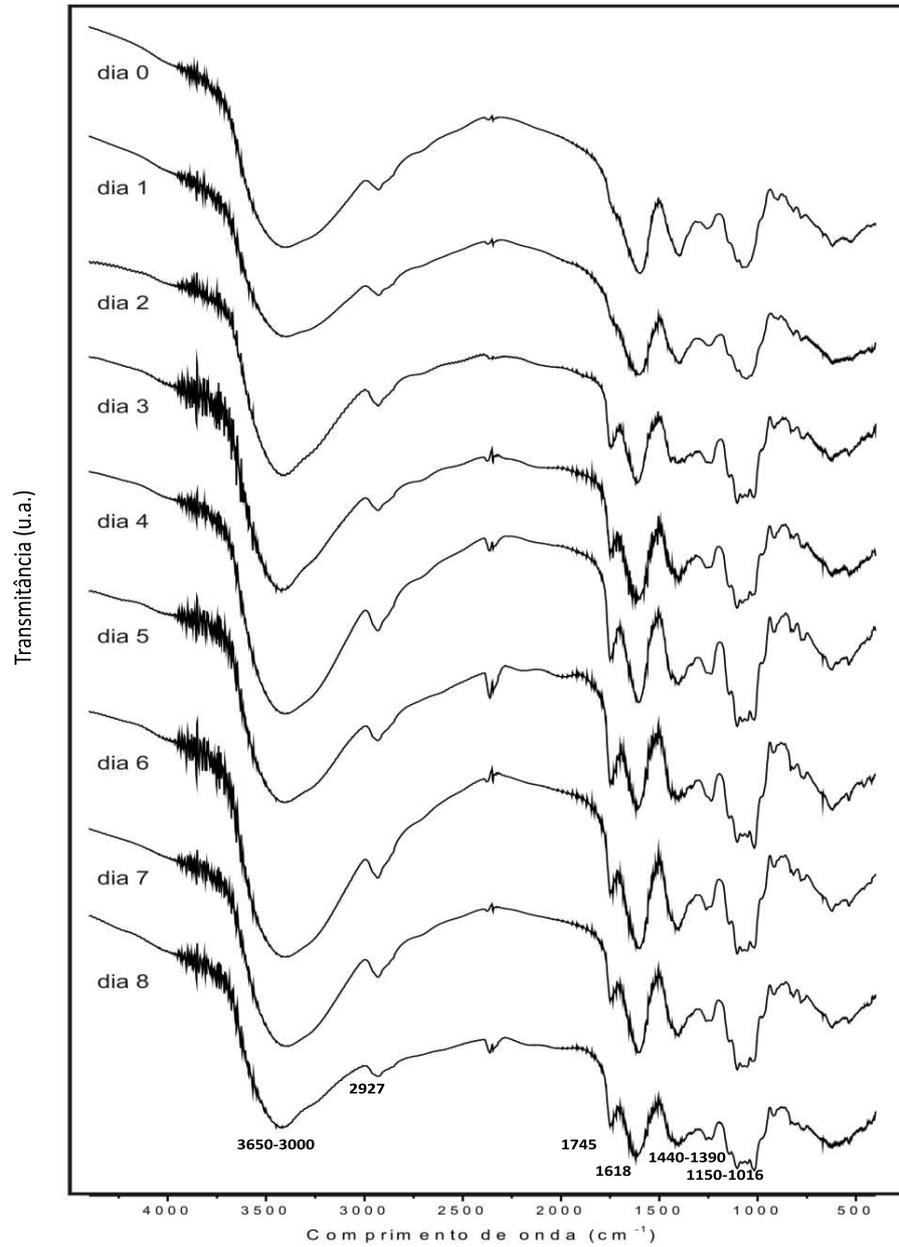


Figura 11 Espectro de infravermelho da fração pectina solúvel durante oito dias de amadurecimento

As análises de espectroscopia na região do infravermelho para as frações de pectina insolúvel com celulase e hemicelulase (Figura 11A) e pectina insolúvel com celulase, hemicelulase e pectinase (Figura 11B) não apresentaram diferenças significativas entre si, apenas pequenas variações de intensidade de algumas bandas de absorção e leves deslocamentos de outras. Porém já apresentaram algumas diferenças em relação à fração de pectina solúvel (Figura 11) durante o amadurecimento.

Nos espectros das frações de pectina insolúvel, a banda em aproximadamente  $1740\text{ cm}^{-1}$ , apareceu desde o dia zero, sugerindo a presença de pectinas de cadeias esterificadas durante todo o amadurecimento. Outra diferença entre as frações de pectina insolúvel e solúvel foi na banda próxima a  $830\text{ cm}^{-1}$ . Essa banda ficou mais intensa nas frações insolúveis, isso pode ser explicado pela ação das enzimas celulase e hemicelulase, que degradaram mais a estrutura da parede celular do fruto liberando outras moléculas de pectinas, sendo assim está condizente com Szymanska-Chargot et al. (2015) que estudando os componentes da parede celular de maçãs verificaram que a pectina apresenta uma banda característica em  $830\text{ cm}^{-1}$ .

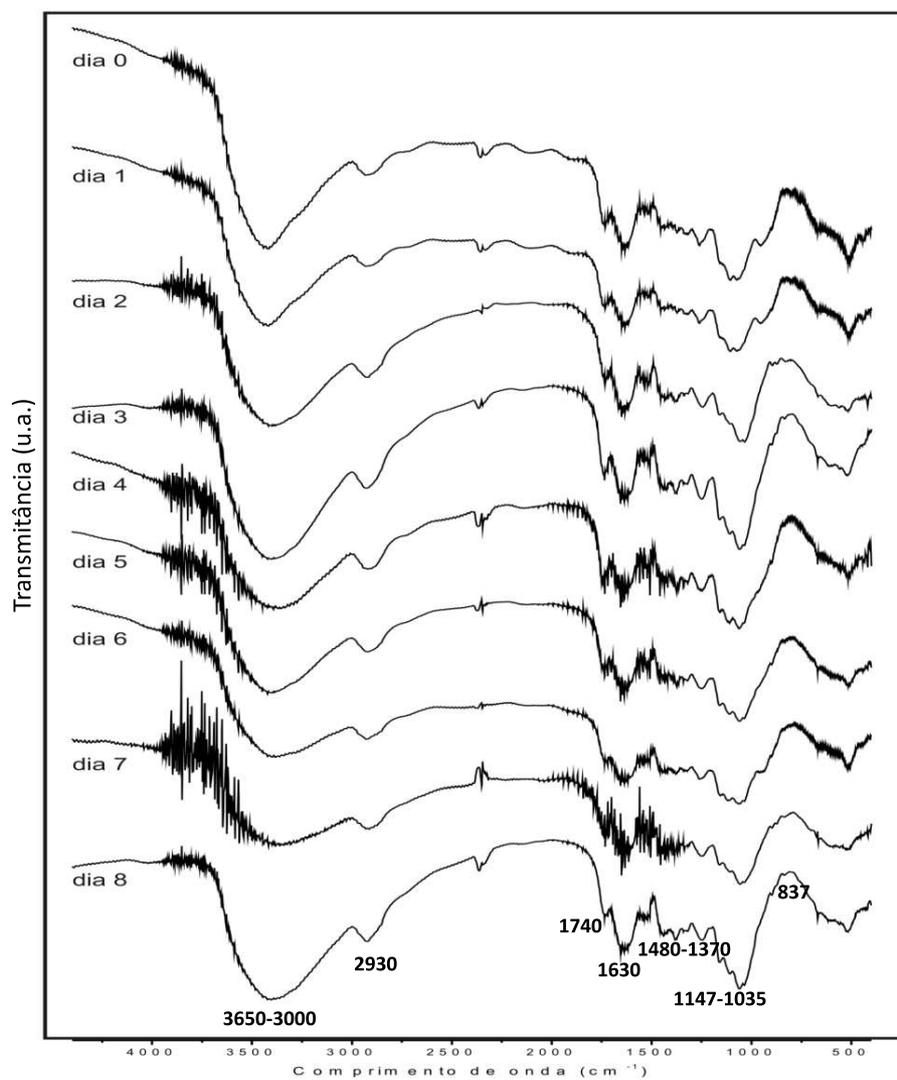


Figura 11A Espectro de infravermelho da fração pectina insolúvel utilizando celulase e hemicelulase durante oito dias de amadurecimento

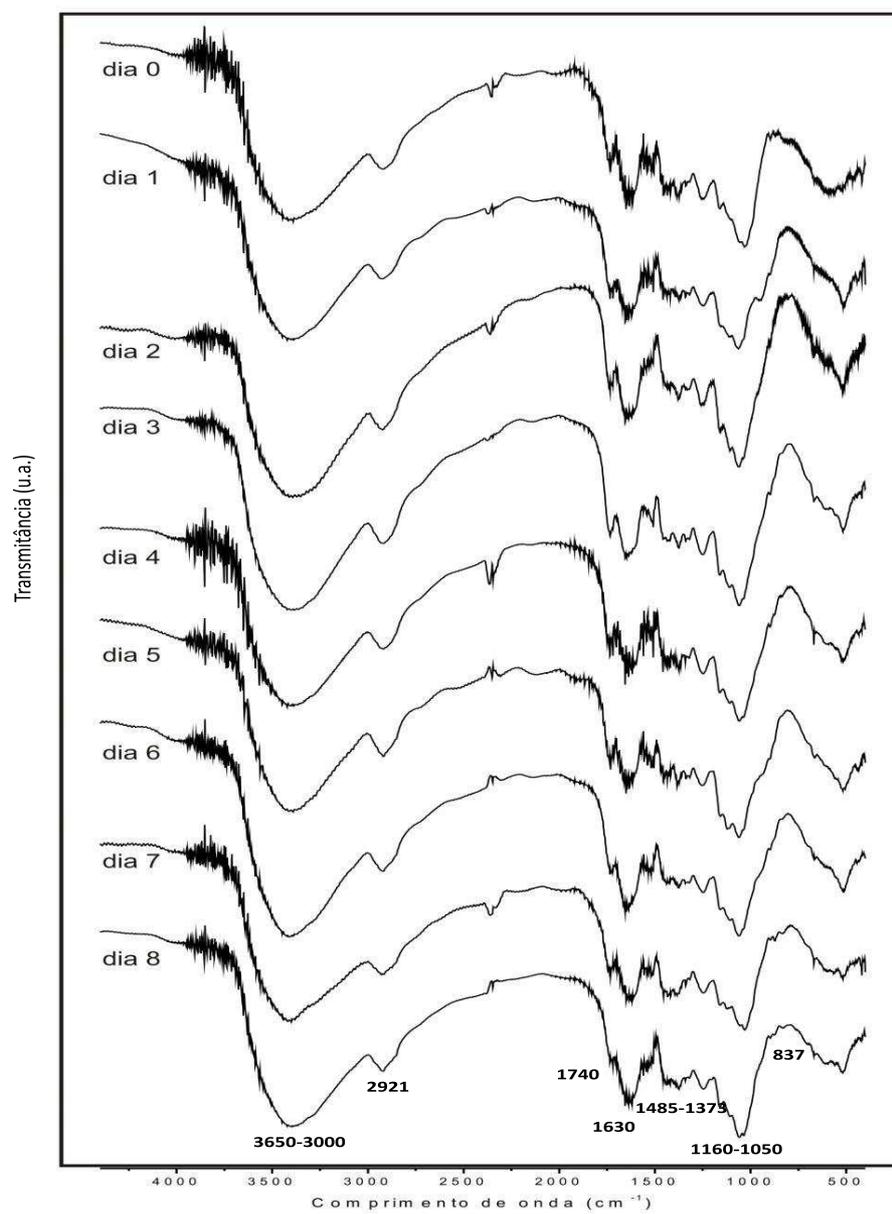


Figura 11B Espectro de infravermelho da fração pectina insolúvel utilizando celulase, hemicelulase e pectinase durante oito dias de amadurecimento

#### 4.5 Teores de Pectina

Os polímeros de pectina são considerados os principais responsáveis pela firmeza dos frutos verdes (ABREU et al., 2012a; KERTESZ, 1951; PAIVA; LIMA; PAIXÃO, 2009) e a sua degradação é um dos eventos mais notáveis durante o amadurecimento e amolecimento do fruto. Em goiabas isso não é diferente; porém, o teor de pectinas, descrito em literatura, para a polpa de 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. Sendo assim, foram realizadas análises de extração de pectina, utilizando o método proposto por McCready e McCoomb (1952) e dois métodos modificados dessa técnica, durante o amadurecimento da goiaba cv. Pedro Sato.

Os resultados para a pectina solúvel (PS), pelos três métodos utilizados foram iguais, devido a extração realizada ser a mesma. O teor de PS aumentou com o amadurecimento, variando-se de 0,13% (m/m) para 0,55% de ácido galacturônico (Figura 12). Comportamentos semelhantes foram observados por Grigio et al. (2011), Linhares et al. (2007), Spiller (2012) e Xisto et al. (2004). Com o processo de maturação, ocorre um aumento da pectina solúvel, o qual é normalmente acompanhado da diminuição da protopectina, indicando que as pectinas solubilizadas são originadas de polímeros mais firmemente integrados a parede celular e possivelmente também a hemicelulose (PAIVA; LIMA; PAIXÃO, 2009).

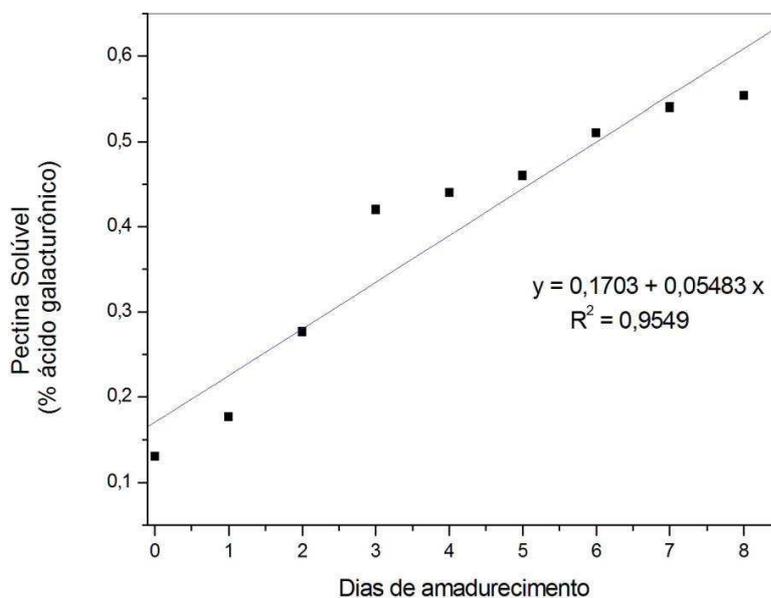


Figura 12 Análise de regressão representativa dos valores de pectina solúvel em goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de armazenamento

Os resultados encontrados para a pectina solúvel e insolúvel (PI) utilizando a metodologia de McCready e McCoomb (1952) estão de acordo com os resultados encontrados na literatura: a pectina solúvel aumenta (Figura 12) e a pectina insolúvel diminui com o amadurecimento (Tabela 2). Porém a soma dessas duas frações (PS e PI) pelo método original é de aproximadamente 1,80%, e está abaixo do valor encontrado na literatura que é em torno de 2,5% (ABREU et al., 2012b; LINHARES et al., 2007; MENDONÇA et al., 2007).

A grande variação na quantidade de pectina durante o amadurecimento é um fator a ser considerado. Assim a afirmação que o teor de pectina total (PT) de goiaba pode aumentar, diminuir ou permanecer constante, demonstra a incerteza dos resultados em torno desse polímero (ABREU et al. 2012b; BULK;

BABIKER; TINAY, 1997; CARVALHO et al., 2001; LINHARES et al., 2007; MENDONÇA et al., 2007; OSHIRO et al., 2008; VILA et al., 2007; XISTO et al., 2004).

Tabela 2 Teores médios (em porcentagem) das frações de pectina insolúvel (PI) de acordo com três métodos distintos de extração durante o amadurecimento de goiabas cv. Pedro Sato

Dias	PI*	PI**	PI***
0	1,53 ± 0,04	4,19 ± 0,02	6,82 ± 0,15
1	1,47 ± 0,01	4,49 ± 0,08	6,78 ± 0,05
2	1,39 ± 0,01	3,97 ± 0,04	6,20 ± 0,08
3	1,36 ± 0,01	3,58 ± 0,08	6,24 ± 0,01
4	1,37 ± 0,04	3,67 ± 0,16	5,85 ± 0,01
5	1,59 ± 0,05	3,83 ± 0,09	6,06 ± 0,02
6	1,42 ± 0,01	4,44 ± 0,04	6,23 ± 0,03
7	1,37 ± 0,02	4,32 ± 0,01	6,18 ± 0,06
8	1,32 ± 0,03	4,22 ± 0,05	5,98 ± 0,03

Os dados são as médias de triplicatas ± desvio-padrão 3 repetições contendo 3 frutos cada.

\*Extração pelo método McCready e McCoomb (1952)

\*\*Extração utilizando celulase

\*\*\*Extração utilizando celulase + hemicelulase

Abreu et al. (2012b), através de análises de fracionamento de açúcares e composição centesimal de goiabas cv. Pedro Sato, sugeriram que a quantidade de pectina em goiabas deveria ser maior que os 2,5% em peso verde (ou 15% em peso seco). Diante desses resultados, foi proposta uma nova etapa na extração da pectina, nos dois métodos modificados de McCready e McCoomb (1952), ou seja, o tratamento do resíduo após a determinação da pectina solúvel, com celulase e pectinase nas frações sobrenadante e sedimento obtendo-se pectina insolúvel, e o outro tratamento utilizou-se a celulase, hemicelulase e pectinase nas mesmas condições.

Quando os dois métodos modificados de extração foram utilizados, observou-se um aumento na quantidade de pectina insolúvel (Tabela 2); porém, um comportamento semelhante ao método original, ou seja, a PI diminuiu durante o amadurecimento.

As enzimas celulase e hemicelulase, usadas na extração de pectina, degradaram mais a estrutura da parede celular do fruto e liberaram outras moléculas de pectinas, que foram hidrolisadas pela pectinase, aumentando assim o teor de pectina. Os resultados demonstraram que uma grande quantidade de pectina fica presa na parede celular do fruto utilizando-se o método de McCready e McCoomb (1952), ao passo que, quando se adiciona as enzimas celulase e hemicelulase, há um aumento significativo no teor de pectinas.

A soma dos valores das pectinas solúvel e insolúvel foi denominada pectina total (Figura 13). O teor de pectina total, durante o amadurecimento de goiaba, pelo método McCready e McCoomb (1952), foi aproximadamente 1,80% de ácido galacturônico, quantidade pequena para ser considerada uma das principais responsáveis pela perda de firmeza em frutos. O teor de pectina total pelo método utilizando as enzimas celulase e pectinase foi em torno de 4,45% de ácido galacturônico, já o método utilizando celulase, hemicelulase e pectinase foi aproximadamente 6,7% de ácido galacturônico. Este último mostrou-se mais eficiente na extração de pectina, revelando uma maior participação deste polissacarídeo na firmeza da parede celular, podendo ser considerado um dos principais responsáveis pelo amolecimento durante o amadurecimento do fruto.

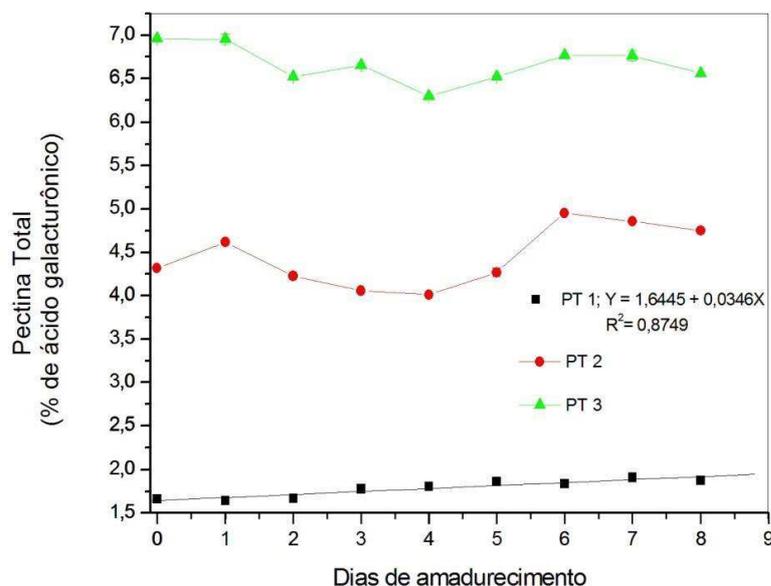


Figura 13 Análise de regressão representativa dos valores de pectina total pelo método McCready e McCoomb (PT 1), utilizando celulase (PT 2), e celulase e hemicelulase (PT 3) de goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de armazenamento

#### 4.6 Atividade de $\beta$ -D-glicosidase

As enzimas poligalacturonase (PG) e pectinametilestrase (PME) são consideradas por muitos pesquisadores como as principais responsáveis pelo amaciamento de frutos durante o amadurecimento (BRUMMEL; HARPSTER, 2001; CHISARI et al., 2010). Porém, em goiaba, não se encontra atividade de PG (LINHARES et al., 2007), ou ela é muito baixa. 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 pode ser efetuada além das enzimas PME e PG, por outras enzimas diferentes.

Outras enzimas que podem estar envolvidas na degradação dos componentes da parede celular e no amolecimento dos frutos são as glicosidases (FAURE, 2002; GERARDI et al., 2001; KONOZY; CAUSSE; FAUROBERT, 2012). Assim, foi determinada a atividade de  $\beta$ -D-glicosidase em goiabas durante oito dias de amadurecimento. A atividade foi determinada nas frações do sobrenadante e do sedimento, porém o sedimento não apresentou atividade. Já a atividade no sobrenadante utilizando o substrato cromogênico, p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, apresentou-se muito baixa, variando de 1,27 para 1,61 mU/ g de polpa de goiaba fresca, do dia zero ao oitavo dia, respectivamente (Figura 14).

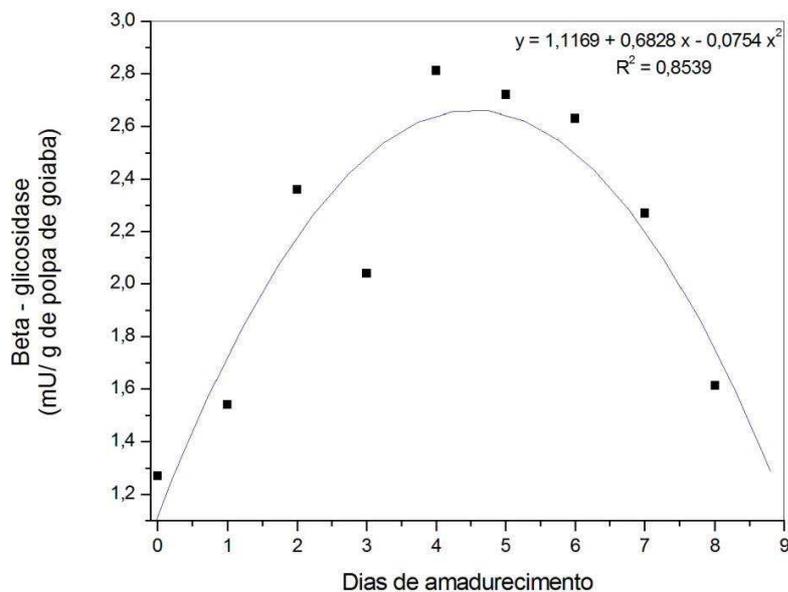


Figura 14 Análise de regressão representativa dos valores da atividade de  $\beta$ -D-glicosidase no sobrenadante de goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de armazenamento utilizando como substrato p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo

Observando a Figura 14, nota-se que a atividade da  $\beta$ -D-glicosidase, aumentou até o quarto dia de amadurecimento, o que coincide com a diminuição da firmeza neste mesmo período de amadurecimento, sendo que a partir desse dia a firmeza permaneceu mais ou menos constante (Figura 5). Isto sugere que esta enzima é uma das responsáveis pela liberação da pectina da parede celular. A partir do quarto dia a atividade da  $\beta$ -D-glicosidase diminuiu até o final do amadurecimento, indicando diminuição do substrato da enzima (polímeros de pectina).

Linhares et al. (2007), estudando o endocarpo de goiabas, verificou que a atividade dessa enzima ocorre quase totalmente no sedimento (87,42%), o sobrenadante respondeu por somente 12,58% dessa atividade. No entanto, esses resultados foram diferentes dos encontrados neste estudo.

O envolvimento de hidrolases da parede celular com a perda de firmeza da polpa tem sido descrito em diversos frutos. Gallon (2010) verificou um aumento na atividade da  $\beta$ -glicosidase com o decréscimo gradativo na firmeza de mamão. Também se observou aumento na solubilização das pectinas com o decréscimo na firmeza de pêra (KETSKA; DAENGKANIT, 1999). Há estudos de baixa atividade da  $\beta$ -glicosidase no amadurecimento de carambola, manga e tomate (ALI; CHIN; LAZAN, 2004; CHIN; ALI; LAZAN, 1999; KONOZY; CAUSSE; FAUROBERT, 2012).

A atividade de  $\beta$ -D-glicosidase foi determinada também, utilizando-se como substrato a salicina. Observou-se um decréscimo na atividade no sobrenadante durante os oito dias de amadurecimento (Figura 15), o sedimento não apresentou atividade. A atividade da enzima foi maior quando a salicina foi utilizada como substrato.

Não há registro da atuação de  $\beta$ -D-glicosidase no substrato salicina em frutos, porém, existem trabalhos que relatam uma alta taxa de hidrólise da enzima sobre este substrato em fungos (DAROIT, 2007).

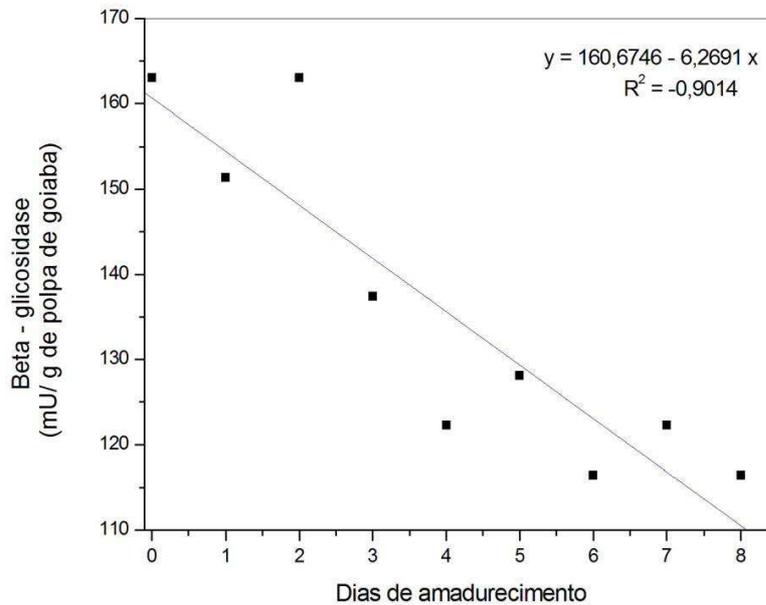


Figura 15 Análise de regressão representativa dos valores da atividade de  $\beta$ -D-glicosidase no sobrenadante de goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de armazenamento utilizando como substrato salicina

Nesse ensaio enzimático, onde a salicina foi utilizada como substrato, a enzima apresentou comportamento diferente em relação ao ensaio enzimático quando se utilizou o p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo como substrato (Figura 14).

Apesar de ter sido detectada a atividade da  $\beta$ -D-glicosidase, com o consequente aumento nos teores de pectina solúvel, não se pode afirmar que essa enzima esteja envolvida no processo de degradação da parede celular de goiabas. Possivelmente outras hidrolases atuam promovendo a despolimerização das frações pécicas da parede celular, durante o amadurecimento. Assim, torna-se improvável que apenas esta enzima seja responsável por mudanças na firmeza. Na realidade, o processo deve envolver uma interação complexa das atividades

das enzimas amilásicas, pécticas e galactosidases, com mudanças físico-químicas na parede (TUCKER, 1993). Deve-se ressaltar que os componentes da parede celular podem ser modificados durante o amadurecimento, mas o tempo, a velocidade e a extensão dessas modificações catalisadas por enzimas variam acentuadamente entre as diferentes variedades (PINTO et al., 2011). Novos estudos deverão ser realizados para determinar a atividade de  $\beta$ -D-glicosidase em goiabas.

#### 4.7 Atividade de esterase

O ensaio de atividade esterásica foi realizado de acordo com a metodologia descrita no item 3.7.3.2 em todos os dias de amadurecimento nas frações extraídas (homogeneizado – HOM, sobrenadante 1 – SOB1, sedimento 1 – SED1, sobrenadante 2 – SOB2, sedimento 2 – SED2). A atividade da esterase no extrato homogeneizado aumentou com o amadurecimento da goiaba (Tabela 3).

Tabela 3 Atividade da esterase no extrato homogeneizado (mU/g\* de polpa fresca)

Dias	Atividade
0	638,06 $\pm$ 23,32
1	853,31 $\pm$ 46,12
2	1349,15 $\pm$ 65,53
3	1491,37 $\pm$ 74,13
4	1695,09 $\pm$ 84,11
5	1879,59 $\pm$ 95,34
6	1522,12 $\pm$ 61,02
7	1606,68 $\pm$ 66,58
8	1614,37 $\pm$ 96,23

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 micromol de  $\alpha$ -naftol por minuto nas condições de ensaio.

Comportamento semelhante foi observado na fração solúvel (SOB1) e na fração de membrana (SED1), cuja soma recuperou  $65,6 \pm 19,1\%$  da atividade do homogeneizado (Tabela 4 e Figura 16). As esterases da goiaba, obtidas neste trabalho, encontram-se predominantemente em membrana com uma média de  $57 \pm 19\%$  da atividade contra  $8,61 \pm 1,8\%$  na fração solúvel.

Tabela 4 Atividade da esterase em mU/g\* de polpa fresca nos extratos solúvel e de membrana

Dia	Esterase Solúvel (SOB1)*		Esterase de membrana (SED1)*		Soma (SOB1 + SED1)	
	% soma	% recuperação	% soma	% recuperação	% soma	% recuperação
0	63,1 ± 3,9	9,90	603,5 ± 17,6	94,6	666,6	104,5
1	77,0 ± 5,2	9,02	605,4 ± 25,8	70,9	682,4	80,0
2	87,1 ± 3,6	6,45	761,1 ± 30,5	56,4	848,2	62,9
3	102,7 ± 6,3	6,88	1064,7 ± 33,6	71,4	1167,4	78,3
4	122,9 ± 7,4	7,25	870,6 ± 35,8	51,4	993,5	58,6
5	133,2 ± 4,9	7,09	864,8 ± 21,5	46,0	998,0	53,1
6	143,8 ± 5,8	9,44	541,9 ± 30,0	35,6	685,7	45,0
7	152,9 ± 8,3	9,52	582,3 ± 25,8	36,2	735,2	45,8
8	192,2 ± 7,2	11,90	814,9 ± 23,3	50,5	1007,1	62,4
	Média =	8,6±1,8	Média=	57±19	.Média=	65,6 ± 19,1

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 micromol de  $\alpha$ -naftol por minuto nas condições de ensaio.

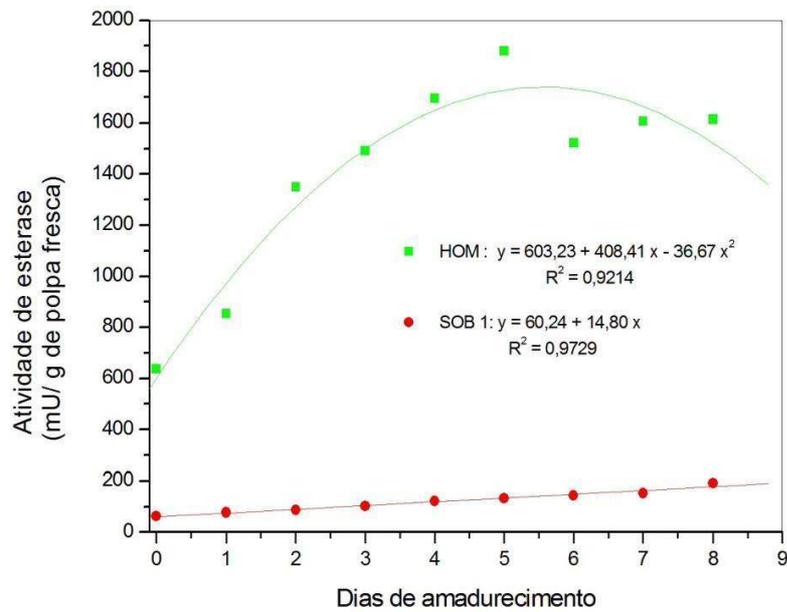


Figura 16 Atividade em mU/g de polpa fresca da esterase solúvel (SOB1) e do homogeneizado (HOM)

Com o tratamento da fração de membrana (SED1) com Triton X-100,  $137,4 \pm 31,6$  da esterase foi solubilizada (Tabela 5), indicando que essa enzima pode estar associada de alguma forma à membrana celular (proteína integrante ou periférica) das células da polpa da goiaba. A fração SED2 não apresentou atividade esterásica.

Tabela 5 Atividade da esterase de membrana solubilizada com Triton X-100 (mU/g\* de polpa fresca)

<b>Dias</b>	<b>Esterase de membrana (SED1)</b>	<b>Esterase solubilizada (SOB2)</b>	<b>% solubilização</b>
0	603,5 ± 17,6	738 ± 61,53	122,3
1	605,4 ± 25,8	939,79 ± 57,76	155,2
2	761,1 ± 30,5	991,68 ± 71,53	130,3
3	1064,7 ± 33,6	1037,81 ± 90,11	97,5
4	870,6 ± 35,8	1026,28 ± 83,55	117,9
5	864,8 ± 21,5	1032,04 ± 80,46	119,34
6	541,9 ± 30,0	1064,71 ± 65,22	196,5
7	582,3 ± 25,8	1018,59 ± 65,22	174,9
8	814,9 ± 23,3	999,37 ± 71,67	122,6
Média =			137,4 ± 31,6

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 micromol de  $\alpha$ -naftol por minuto nas condições de ensaio.

O aumento na atividade da esterase solúvel durante o amadurecimento (Figura 16) e consequente diminuição da atividade da esterase de membrana a partir do terceiro dia (Tabela 5) é um indicativo de que a parede das células está se desorganizando 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. Algumas hidrolases de parede celular aumentam sua atividade durante o amadurecimento, e este aumento é coincidente com o amolecimento do fruto (PINTO et al., 2013).

A explicação para a rápida diminuição da firmeza da goiaba, provavelmente deve-se à ação conjunta da PME, de outras esterases e da  $\beta$ -D-glicosidase, identificada neste trabalho (Figura 14), que liberam os polímeros de pectina da parede celular.

A alta atividade das esterases de membrana/parede celular (Tabela 5) pode ser responsável pela hidrólise de ligações cruzadas entre cadeias de pectinas e entre cadeias de pectinas e outros polímeros, liberando os polímeros de pectina, que provavelmente pela ação da  $\beta$ -D-glicosidase, migram para o interior da célula até o quarto dia de amadurecimento.

Para avaliar apenas a atividade esterásica sobre o  $\alpha$ -naftilacetato, as atividades nas frações extraídas foram determinadas segundo Morgan et al. (1994), através da leitura da absorbância a 322 nm. A atividade da esterase a 322 nm nunca foi medida durante o amadurecimento de goiabas, somente em eletroforese. Spliller (2012) ao determinar as esterases solúveis, por meio das atividades eletroforéticas, verificou grande número de picos nos primeiros dias de amadurecimento e sua diminuição da atividade com o amadurecimento culminando com a ausência da atividade no quinto dia.

Porém, ao determinar a atividade esterásica em todas as frações, não se observou ausência de atividade a partir do quinto dia, mas apenas um decréscimo durante o amadurecimento. O desaparecimento da atividade poderia coincidir com o desaparecimento dos polímeros de pectina da parede celular, indicando que essa enzima poderia ser a responsável pela liberação desses polímeros de pectina da parede.

A atividade da esterase no extrato homogeneizado diminuiu durante os oito dias de amadurecimento. Comportamento semelhante foi observado na fração solúvel (SOB1) e na fração de membrana (SED1), cuja soma recuperou  $93,6 \pm 13,9\%$  da atividade do homogeneizado (Tabela 6 e Figura 17).

Tabela 6 Atividade da esterase em mU/g\* de polpa fresca nos extratos homogeneizado, solúvel e de membrana

<b>Dias</b>	<b>Homogeneizado (HOM)</b>	<b>Esterase solúvel (SOB1)</b>	<b>Esterase de membrana (SED1)</b>	<b>SOB1+ SED1</b>	<b>% reuperação</b>
0	643,22 ± 44,6	24,01 ± 1,5	531,52 ± 29,7	555,5	86,5
1	578,90 ± 38,6	42,86 ± 2,9	480,08 ± 29,7	522,9	90,3
2	411,66 ± 44,6	50,58 ± 1,5	322,34 ± 11,9	372,9	90,6
3	347,34 ± 38,6	40,29 ± 2,9	338,70 ± 28,1	379,0	109,1
4	394,35 ± 29,7	42,01 ± 1,5	281,19 ± 11,9	323,2	81,9
5	377,21 ± 29,7	17,14 ± 1,5	240,04 ± 14,8	257,2	68,2
6	286,09 ± 19,3	11,15 ± 1,5	274,33 ± 14,8	285,5	99,8
7	334,34 ± 25,7	16,30 ± 1,5	342,91 ± 14,8	359,2	107,4
8	377,21 ± 29,7	25,72 ± 2,6	385,78 ± 25,7	411,5	109,1
				Média =	93,6 ± 13,9

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 micromol de  $\alpha$ -naftol por minuto nas condições de ensaio.

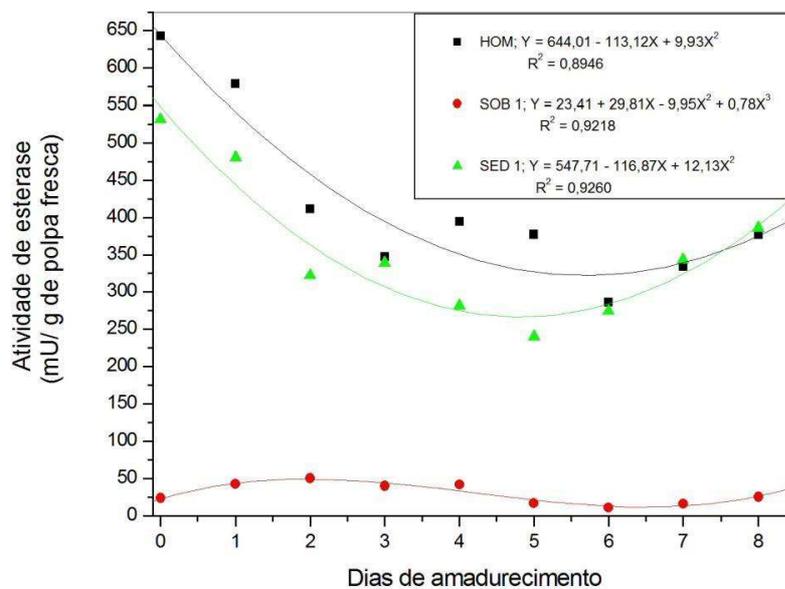


Figura 17 Atividade em mU/g de polpa fresca da esterase solúvel (SOB1), de membrana (SED1) e do homogeneizado (HOM)

A fração da esterase de membrana (SED1) também foi tratada com Triton X-100, e  $109 \pm 15,1\%$  da esterase foi solubilizada (Tabela 7). A fração SED2 não apresentou atividade esterásica.

Tabela 7 Atividade da esterase de membrana solubilizada com Triton X-100 (mU/g\* de polpa fresca)

<b>Dias</b>	<b>Esterase de membrana (SED1)</b>	<b>Esterase solubilizada (SOB2)</b>	<b>% solubilização</b>
0	531,52 ± 29,7	548,66 ± 29,7	103,2
1	480,08 ± 29,7	565,81 ± 51,4	117,9
2	322,34 ± 11,9	363,49 ± 11,9	112,8
3	338,70 ± 28,1	356,63 ± 11,9	105,3
4	281,19 ± 11,9	397,78 ± 11,9	141,5
5	240,04 ± 14,8	248,61 ± 14,8	103,6
6	274,33 ± 14,8	295,76 ± 12,9	107,8
7	342,91 ± 14,8	356,63 ± 11,9	104,0
8	385,78 ± 25,7	329,20 ± 20,6	85,3
Média =			109,0 ± 15,1

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 micromol de  $\alpha$ -naftol por minuto nas condições de ensaio.

Os resultados da atividade nas frações de esterase a 322 nm, ainda não despertam a atenção para a liberação da pectina da parede celular durante o amadurecimento, sendo que os mecanismos que regulam as alterações na firmeza durante o amadurecimento de goiabas não são totalmente compreendidos.

As modificações diferenciadas nos vários componentes da parede celular indicam que existem mecanismos reguladores específicos quanto à concentração e tipo das enzimas (isoformas) e ao tempo de aparecimento de tais estruturas enzimáticas (ASIF; NATH, 2005). Dessa forma, torna-se necessário um estudo mais detalhado para elucidar o processo de amaciamento do mesocarpo de goiaba durante o seu amadurecimento.

## 5 CONCLUSÃO

- Os teores de pectina, pelo método de extração utilizando as enzimas celulase e hemicelulase, foram maiores que os teores citados na literatura, confirmando assim, que as pectinas são realmente responsáveis pela firmeza dos frutos.
- Foram detectados dois tipos de compostos fenólicos não identificados, que aumentaram com o amadurecimento do fruto e que podem ser responsáveis pela interligação das cadeias de pectinas.
- Foi identificada a  $\beta$ -D-glicosidase que atua nas ligações cruzadas entre as cadeias de pectinas.

### Agradecimentos

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, J. R. et al. Histochemistry and morphoanatomy study on guava fruit during ripening. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 179-186, jan./mar. 2012a.
- 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, jan./mar. 2012b.
- ALI, Z. M.; CHIN, L. H.; LAZAN, H. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruit. **Plant Science**, Shannon, v. 167, n. 2, p. 317-327, Aug. 2004.
- AMNUAYSIN, N.; JONES, M. L.; SERAYPHEAP, K. Changes in activities and gene expression of enzymes associated with cell wall modification in peels of hot water treated bananas. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 142, p. 98-104, July 2012.
- ANGELIS, R. C. de. **Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde**: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas. São Paulo: Atheneu, 2001. 295 p.
- ANUÁRIO brasileiro de fruticultura 2013. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2013. 129 p.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 29, n. 4, p. 719-739, Sept. 2005.
- ASIF, M. H.; NATH, P. Expression of multiple forms of polygalacturonase gene during ripening in banana fruit. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, n. 2, p. 177-184, Feb.2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 19<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, 2012. 3000 p.

AWAD, M. **Fisiologia pós-colheita de frutos**. São Paulo: Nobel, 1993. 114 p.

AZZOLINI, M.; JACOMINO, A. P.; BRON, I. U. Indices to evaluate postharvest quality of guavas under different maturation stages. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 2, p. 139-145, fev. 2004.

BATISTA, P. F. et al. Association of 1-MCP with carnauba waxes in the conservation of guavas 'Paluma'. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 4, n. 1, p. 22-26, jan./mar. 2009.

BENNETT, A. B.; LABAVITCH, J. M. Ethylene and ripening regulated expression and function of fruit cell wall modifying proteins. **Plant Science**, Amsterdam, v. 175, n. 1/2, p. 130-136, July/Aug. 2008.

BEVERIDGE, T.; LOUBERT, E.; HARRISON, J. E. Simple measurement of phenolic esters in plant cell walls. **Food Research International**, Barking, v. 33, n. 9, p. 775-783, 2000.

BITTER, T.; MUIR, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Chemistry**, New York, v. 34, p. 330-334, Apr. 1962.

BRANDÃO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. **Polímeros**, São Carlos, v. 9, n. 3, p. 38-44, jul./set. 1999.

BRUMMELL, D. A. Cell wall disassembly in ripening fruit. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 33, n. 2, p. 103-119, Feb. 2006.

BRUMMELL, D. A.; HARPSTER, M. H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 77, n. 1/2, p. 311-340, Sept. 2001.

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

CAMPOS, A. J. et al. Gamma radiation and passive modified atmosphere on the quality of guavas 'Pedro Sato'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, p. 350-356, out. 2011. Volume especial.

CANTERI, M. H. G. et al. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, São Carlos, v. 22, n. 2, p. 149-157, 2012.

CARVALHO, H. A. et al. Efeito da atmosfera modificada sobre componentes da parede celular da goiaba. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 3, p. 605-615, maio/jun. 2001.

CAVALINI, F. C. et al. Maturity indexes for 'Kumagai' and 'Paluma' guavas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 176-179, ago. 2006.

CHAN, S. Y.; CHOO, W. S. Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks. **Food Chemistry**, Oxford, v. 141, n. 4, p. 3752-3758, Dec. 2013.

CHATJIGAKIS, A. K. et al. FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 37, n. 4, p. 395-408, Dec. 1998.

CHIN, L. H.; ALI, Z. M.; LAZAN, H. Cell wall modifications, degrading enzymes and softening of carambola fruit during ripening. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 335, p. 767-775, June 1999.

CHISARI, M. et al. Distribution of degradative enzymatic activities in the mesocarp of two melon groups. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 1016-1023, May 2010.

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

COSER, S. M. et al. Assessment of genetic diversity in *Psidium guajava* L. using different approaches. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 148, p. 223-229, Dec. 2012.

DAROIT, D. J. **Caracterização de uma beta-glicosidase de *Monascus purpureus***. 2007. 137 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

FADDA, A.; MULAS, M. Chemical changes during myrtle (*Myrtus communis* L.) fruit development and ripening. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 125, n. 3, p. 477-485, June 2010.

FAURE, D. The Family-3 glycoside hydrolases: from housekeeping functions to host-microbe interactions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1485-1490, Apr. 2002.

FLORES, G. et al. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. **Food Chemistry**, Oxford, v. 170, p. 327-335, Mar. 2015.

GALLON, C. Z. **Amolecimento precoce da polpa e sua relação com as modificações da parede celular em mamões 'Golden'**. 2010. 113 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2010.

GERARDI, C. et al. Purification and characterisation of a  $\beta$ -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. **Plant Science**, Shannon, v. 160, n. 5, p. 795-805, Apr. 2001.

GOULAO, L. F. Pectin de-esterification and fruit softening: revisiting a classical hypothesis. **Stewart Postharvest Review**, London, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2010.

GRIGIO, M. L. et al. The change in atmospheric guavas var. Paluma to reduce the effect of mechanical damage in postharvest. **Revista Agro@ambiente On-line**, Boa Vista, v. 5, n. 1, p. 57-65, jan./abr. 2011.

HSIEH, C. L. et al. Preventive effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaves and its active compounds against [alpha]-dicarbonyl compounds-induced blood coagulation. **Food Chemistry**, Oxford, v. 103, n. 2, p. 528-535, 2007.

HUTZLER, P. et al. Tissue localization of phenolic compounds implants by confocal laser scanning microscopy. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 323, p. 953-965, June 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa agrícola municipal**. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa\\_resultados.php?id\\_pesquisa=44](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=44)>. Acesso em: 25 nov. 2014.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **A cultura da goiaba em São Paulo**. São Paulo, 2005. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=1902>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

INTERNATIONAL PECTIN PRODUCERS ASSOCIATION. **What is pectin?** Disponível em: <[http://www.ippa.info/what\\_is\\_pectin.htm](http://www.ippa.info/what_is_pectin.htm)>. Acesso em: 2 dez. 2014.

JACOMINO, A. P. et al. Postharvest conservation of guavas through carnauba wax emulsion applications. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 401-405, dez. 2003.

JAIN, N. et al. Compositional and enzymatic changes in guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. **Acta Physiologiae Plantarum**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 357-362, 2001.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytical enzymes: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, Sept. 2005.

JOLIE, R. P. et al. Plant pectin methylesterase and its inhibitor from kiwi fruit: interaction analysis by surface plasmon resonance. **Food Chemistry**, Oxford, v. 121, n. 1, p. 207-214, July 2010.

KAYS, S. J. **Postharvest physiology of perishable plant products**. New York: Avi Book, 1991. 532 p.

KERTESZ, Z. I. **The pectic substances**. New York: Interscience, 1951. 628 p.

KETSKA, S.; DAENGGANIT, T. Firmness and activities of polygalacturonase, pectinesterase, b-galactosidase and cellulase in ripening durian harvested at different stages of maturity. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 80, n. 3/4, p. 181-188, Apr. 1999.

KONOZY, E. H. E.; CAUSSE, M.; FAUROBERT, M. Cell wall glycosidase activities and protein content variations during fruit development and ripening in three texture contrasted tomato cultivars. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riade, v. 19, n. 3, p. 277-283, July 2012.

KUSKOSKI, E. M. et al. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, jul./ago. 2006.

LE BOURVELLEC, C. et al. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material: part II, quantification and impact of cell wall drying. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, v. 1725, n. 1, p. 1-9, Aug. 2005.

LIM, Y. Y.; LIM, T. T.; TEE, J. J. Antioxidant properties of several tropical fruits: a comparative study. **Food Chemistry**, Oxford, v. 103, n. 3, p. 1003-1008, 2007.

LIMA, A. V. **Qualidade pós-colheita da goiaba ‘Pedro Sato’ tratada com Ca ‘CI IND.2’ e 1-MCP em condições ambiente**. 2004. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

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, n. 1, p. 41-44, jan./mar. 2010.

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.

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, maio/jun. 2007.

LIRA-ORTIZ, A. L. et al. Pectins from waste of prickly pear fruits (*Opuntia albicarpa* Scheinvar ‘Reyna’): chemical and rheological properties. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 37, p. 93-99, June 2014.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Review**, New York, v. 66, n. 3, p. 506-577, Sept. 2002.

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

MANRIQUE, G. D.; LAJOLO, F. M. FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 99-107, May 2002.

MARKHAM, K. R. et al. Cytoplasmic accumulation of flavonoids in flower petals and its relevance to yellow flower colouration. **Phytochemistry**, Oxford, v. 58, n. 3, p. 403-413, Oct. 2001.

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, 1952.

MELO, P. S. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of agroindustrial residues. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 6, p. 1088-1093, jun. 2011.

MENDONÇA, R. D. et al. Physical and chemical characteristics of 'Cortibel 1' and 'Cortibel 4' guavas stored in environmental conditions. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 685-692, 2007.

MERCADO-SILVA, E.; BAUTISTA, P. B.; GARCIA-VELASCO, M. A. Fruit development, harvest index ripening changes of guavas produced in central Mexico. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 143-150, Apr. 1998.

MONSOOR, M. A.; KALAPATHY, U.; PROCTOR, A. Determination of polygalacturonic acid content in pectin extracts by diffuse reflectance fourier transform infrared pectroscopy. **Food Chemistry**, London, v. 74, n. 2, p. 233-238, Aug. 2001.

MORGADO, C. M. A. et al. Conservação pós-colheita de goiabas 'Kumagai': efeito do estágio de maturação e da temperatura de armazenamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1001-1008, dez. 2010.

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.

MORRIS, G. A.; FOSTER, T. J.; HARDING, S. E. The effect of the degree of esterification on the hydrodynamic properties of citrus pectin. **Food Hydrocolloid**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 227-235, May 2000.

MUNHOZ, C. L.; SANJINEZ-ARGANDO, E. J.; SOARES, M. S. Extraction of pectin from dehydrated guava. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 119-125, mar. 2010.

NANTITANON, W. et al. Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. **Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 43, n. 7, p. 1095-1103, Sept. 2010.

NOELTING, G.; BERNFELD, P. Sur les enzymes amylolytiques: III., la  $\beta$ -amylase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d' $\alpha$ -amylase. **Helvetica Chimica Acta**, Berlin, v. 31, n. 1, p. 286-290, 1948.

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

OLIVEIRA, D. S. et al. Vitamin C, carotenoids, phenolic compounds and antioxidante activity of guava, mango and papaya from Ceasa of Minas Gerais State. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, Maringá, v. 33, n. 1, p. 89-98, 2011.

OLIVEIRA, M. N. S. et al. Estádio de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos e de textura da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p.380-386, dez. 2006.

ORIGIN LAB CORPORATION. **Data analysis and technical graphics**. Northampton, 2000. Software.

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, n. 4, p. 1072-1079, Oct. 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: SBF, 2008. 1 CD-ROM.

PAIVA, E. P.; LIMA, M. S.; PAIXÃO, J. A. Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. **Revista Iberoamericana de Polímero**, México, v. 10, n. 4, p. 196-211, jul. 2009.

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.

PARR, A. J. et al. Ester-linked phenolic components of carrot cell walls. **Journal of the Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 7, p. 2468-2471, July 1997.

PEREIRA, T. et al. Características físicas e químicas de goiaba cv. Cortibel (*Psidium guajava*) estocadas sob refrigeração em filmes x-tend\*. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 11-16, jan./mar. 2005.

PINELO, M.; ARNOUS, A.; MEYER, A. S. Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, n. 11, p. 579-590, Nov. 2006.

PINHEIRO, E. R. **Pectina da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*):** otimização da extração com ácido cítrico e caracterização físico-química. 2007. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2007.

PINTO, L. K. A. et al. Activity of pectin methylesterase and  $\beta$ -galactosidase during the ripening of papaya fruits cv. 'Golden'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 713-722, set. 2011.

PINTO, L. K. A. et al. Activity of pectin methylesterase and  $\beta$ -galactosidase enzymes in 'Golden' papaya stored under diferente oxygen concentrations. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 1, p. 15-22, mar. 2013.

PINTO, P. M. et al. Maturity stages of 'Kumagai' and 'Pedro Sato' guava fruits for fresh cut. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 37-43, 2010.

PONCE, N. M. A. 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, n. 4, p. 2562-2570, Feb. 2010.

POSÉ, S. et al. Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruits using AFM. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 88, n. 3, p. 882-890, Apr. 2012.

RAVEN, P. H. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

REIS, K. C. dos et al. Physical-chemistry evaluate of guava osmotic dehydration in solutions different. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 781-785, maio/jun. 2007.

SALATO, G. S. et al. Developmental changes in cell wall polysaccharides from sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars with contrasting firmness. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 84, n. 1, p. 66-73, Oct. 2013.

SCHENKEL, E. P.; CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007. p. 519-535.

SEVERO, J. et al. Antioxidant capacity and phytochemical composition of physalis fruit (*Physalis Peruviana*, L.) during ripening and storage. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 16, n. 1/4, p. 77-82, jan./dez. 2010.

SILA, D. N. et al. Pectins in processed fruits and vegetables: part II-structure-function relationships. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 8, n. 2, p. 86-104, Apr. 2009.

SILVERSTEIN, R. M. **Spectrometric identification of organic compounds**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: J. Wiley, 1974. 340 p.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 1102 p.

SINGH, D. P. et al. Influence of boron on carrot cell wall structure and its resistance to fracture. **Journal of the Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 16, p. 9181-9189, July 2010.

SINGH, S. P.; PAL, R. K. Response of climacteric-type guava (*Psidium guajava* L.) to postharvest treatment with 1-MCP. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 47, n. 3, p. 307-314, March 2008.

SOARES, M. et al. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas niágara e isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 59-64, mar. 2008.

SOUZA, S. M. A. et al. Conservação de produto minimamente processado de goiabas 'Kumagai' e 'Pedro Sato'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 3, p. 847-855, set. 2009.

SPILLER, S. H. **Pectina de goiaba: avaliação de métodos de extração e análise de esterases durante o amadurecimento: solubilização de membranas e eletroforese**. 2012. 102 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

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

STEWART, D.; MORISSON, I. M. FT-IR spectroscopy as a tool for the study of biological and chemical treatments of barley straw. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 60, n. 4, p. 431-436, 1992.

SZYMANSKA-CHARGOT, M. et al. Combining FT-IR spectroscopy and multivariate analysis for qualitative and quantitative analysis of the cell wall composition changes during apples development. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 115, p. 93-103, Jan. 2015.

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

THAIPONG, K. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 6/7, p. 669-675, Sept./Nov. 2006.

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K.; HANDA, A. V. Chemistry and uses of pectin: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 37, n. 1, p. 47-73, 1997.

TSAI, P. J. et al. Strengthening the texture of dried guava slice by infiltration of phenolic compounds. **Food Research International**, Barking, v. 43, n. 3, p. 825-830, Apr. 2010.

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

VIEIRA, S. M. J. et al. Effect of ultraviolet-C radiation on “Kumagai” guavas infested by *Ceratitis capitata* (Diptera—*Tephritidae*) and on physical parameters of postharvest. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 165, p. 295-302, Jan. 2014.

VIEIRA, S. M. J. et al. Physical characteristics of guava (*Psidium guajava* L.) submitted to hot water treatment. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 12, n. 4, p. 408-414, jul./agos. 2008.

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.

VILAS BOAS, B. M. et al. Physical, chemical and biochemical characterization of pequi fruit harvested at different stages of development. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 12, p. 2285-2290, dez. 2013.

WALDRON, K. W. et al. Plant cell walls and food quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 2, n. 4, p. 128-146, Oct. 2003.

WEI, J. M. 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, n. 2, p. 147-154, May 2010.

WERNER, E. T. et al. Calcium chloride application in the post-harvest of guavas cortibel. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 2, p. 511-518, 2009.

WU, J. W. et al. Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein. **Food Chemistry**, Oxford, v. 113, n. 1, p. 78-80, Mar. 2009.

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 Agroquímica) - 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. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 113-118, jan./fev. 2004.

YADAV, S. et al. Pectin lyase: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 44, n. 1, p. 1-10, Jan. 2009.

YAMAMOTO, E. L. M. et al. Função do cálcio na degradação da parede celular vegetal de frutos. **Revista Verde**, Mossoró, v. 6, n. 2, p. 49-55, abr./jun. 2011.

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, n. 5, p. 1037-1042, May 2010.

YAPO, B. M. Pectic substances: from simple pectic polysaccharides to complex pectins: a new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 86, n. 2, p. 373-385, Aug. 2011.

ZAIDEL, D. N. A.; MEYER, A. S. Biocatalytic cross-linking of pectic polysaccharides for designed food functionality: structures, mechanisms, and reactions. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, London, v. 1, n. 3, p. 207-219, July 2012.

ZHANG, L. et al. Effect of degradation methods on the structural properties of citrus pectin. **Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 61, n. 2, p. 630-637, May 2015.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **Manual do Saneste**: sistema de análise estatística para microcomputadores. Pelotas: UFPel, 1991. 102 p.

## ANEXOS

	Página
Tabela 1A Resumo da análise de variância para perda de massa de goiabas cv. Pedro Sato, durante oito dias de armazenamento em condições ambientais.....	93
Tabela 2A Resumo da análise de variância para firmeza e compostos fenólicos de goiabas cv. Pedro Sato, durante oito dias de armazenamento em condições ambientais.....	93
Tabela 3A Resumo da análise de variância para pectina solúvel de goiabas cv. Pedro Sato, durante oito dias de armazenamento em condições ambientais.....	93
Tabela 4A Resumo da análise de variância para três técnicas de extração de pectina (insolúvel e total) de goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de amadurecimento.....	94
Tabela 5A Resumo da análise de variância de $\beta$ -D-glicosidase em goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de amadurecimento utilizando os substratos p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e salicina.....	94
Tabela 6A Resumo da análise de variância da atividade de esterase em leitura a 500 e 322 nm em todas as frações extraídas de goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de amadurecimento.....	94

Tabela 1A Resumo da análise de variância para perda de massa de goiabas cv. Pedro Sato, durante oito dias de armazenamento em condições ambientais

FV	GL	QM
		Perda de massa
Dias	7	116,4403**
Resíduo	16	0,1273
CV%		3,089

\*\*Teste de F significativo, a 5% de probabilidade.

Tabela 2A Resumo da análise de variância para firmeza e compostos fenólicos de goiabas cv. Pedro Sato, durante oito dias de armazenamento em condições ambientais

FV	GL	QM	
		Firmeza	Compostos fenólicos
Dias	8	238,4542**	2890,4421**
Resíduo	18	0,4878	62,9674
CV (%)		7,261	2,835

\*\* Teste de F significativo, a 5% de probabilidade.

Tabela 3A Resumo da análise de variância para pectina solúvel de goiabas cv. Pedro Sato, durante oito dias de armazenamento em condições ambientais

FV	GL	QM
		PS
Dias	8	0,07419**
Resíduo	18	0,0002334
CV%		3,921

\*\* Teste de F significativo, a 5% de probabilidade.

Tabela 4A Resumo da análise de variância para três técnicas de extração de pectina (insolúvel e total) de goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de amadurecimento

FV	GL	QM	
		PI	PT
Técnicas	2	158,4444**	154,0667**
Dias	8	0,3706**	0,2899**
Técnicas*Dias	16	0,1569**	0,1776**
Resíduo	54	0,003616	0,003570
CV (%)		1,533	1,410

\*\* Teste de F significativo, a 5% de probabilidade.

Tabela 5A Resumo da análise de variância de  $\beta$ -D-glicosidase em goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de amadurecimento utilizando os substratos p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e salicina

FV	GL	QM	
		pNP $\beta$ G	Salicina
Dias	8	0,9361**	1088,3645**
Resíduo	18	0,03464	340,8274
CV (%)		8,700	13,615

\*\* Teste de F significativo, a 5% de probabilidade.

Tabela 6A Resumo da análise de variância da atividade de esterase em leitura a 500 e 322 nm em todas as frações extraídas de goiabas cv. Pedro Sato durante oito dias de amadurecimento

FV	GL	QM	
		Esterase 500 nm	Esterase 322 nm
Frações	4	9081155,40**	1067283,88**
Dias	8	225416,13**	60157,11**
Frações*Dias	32	98108,98**	11007,60**
Resíduo	90	545,49	442,93
CV (%)		3,547	8,724

\*\* Teste de F significativo, a 5% de probabilidade.