

**ATIVIDADE DA ESTERASE DURANTE O AMADURECIMENTO DE GOIABAS:
SOLUBILIZAÇÃO DE MEMBRANA E ANÁLISE ELETROFORÉTICA**

LÍVIA CABRAL SÁTIRO LUIZ¹, LUCIANA LOPES SILVA PEREIRA²; CUSTÓDIO DONIZETE DOS SANTOS³, TAMARA REZENDE MARQUES⁴, CELESTE MARIA PATTO DE ABREU⁵, ANGELITA DUARTE CORRÊA⁶

RESUMO

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

Palavras-chaves: Esterase, Eletroforese, Amadurecimento de Goiabas

INTRODUÇÃO

¹ Graduanda em Química, DQI/UFLA, liviacsatiro@yahoo.com.br

² Doutoranda em Agroquímica, DQI/UFLA, lucianalsp@yahoo.com.br

³ Professor Titular, DQI/UFLA, santoscd@dqi.ufla.br

⁴ Graduada em Química, DQI/UFLA, tamara_rezende@hotmail.com

⁵ Professor Titular, DQI/UFLA, celeste@dqi.ufla.br

⁶ Professor Titular, DQI/UFLA, angelita@dqi.ufla.br

¹ Graduando em Engenharia de Alimentos, UFLA vanessardsouza@gmail.com

² Prof. Adjunto, DCA/ UFLA, joaodedeus@dca.ufla.br

³ Prof. Adjunto, DCA/UFLA, anacarlamp@dca.ufla.br

⁴ Prof. Adjunto, DCA/UFLA, sandra@dca.ufla.br

⁵ Prof. Adjunto, DCA/UFLA, luizapinheirocarvalho@hotmail.com

⁶ Prof. Assistente, Departamento de Nutrição, UFPI, camilacarvalhomenezes@yahoo.com.br

No Brasil, a cultura da goiaba apresenta grande importância socioeconômica, dadas as suas amplas e variadas formas de utilização. Altamente cultivada nas regiões tropicais e subtropicais, devido ao seu elevado valor nutritivo, excelente aceitação do consumo *in natura*, capacidade de desenvolvimento em condições adversas e grande aplicação industrial (MAIA et al., 2002). É considerada um fruto bastante atrativo, em razão de sua delicada cor e agradável aroma, além de ser uma das mais completas e equilibradas frutas no que diz respeito ao valor nutritivo, contendo alto teor de vitamina C, quantidades razoáveis de pró-vitamina A, vitaminas do complexo B e sais minerais como cálcio, fósforo e ferro (MANICA et al., 2000; PEREIRA, 1995; PEREIRA & MARTINEZ, 1986; SATO et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2006).

Altamente perecível, devido ao seu intenso metabolismo durante o amadurecimento, a goiaba tem vida útil que pode chegar de 3 até 5 dias sob temperatura ambiente (CARVALHO, 1994; DURIGAN, 1997; GONATTI NETTO et al., 1996). A firmeza dos frutos verdes e maduros se deve, principalmente, aos polímeros de pectina, que podem estar metiladas em diferentes graus (KERTESZ, 1951; FERTONANI, 2006). Estas podem estar ligadas a íons, principalmente Ca^{2+} , que mantém cadeias adjacentes unidas entre si, ou ainda apresentar suas cadeias glicosídicas interligadas por compostos fenólicos (TAIZ & ZEIGER, 2004; CHITARRA & CHITARRA, 2005).

Durante o amadurecimento da goiaba, a perda de firmeza deve-se a atividade de enzimas hidrolíticas que promovem intensa solubilização das pectinas constituintes da parede celular, principalmente as pectinametilesterases (PME) e poligalacturonases (PG) (JAIN et al, 2001; OLIVEIRA et al., 2006; TUCKER, 1993). A goiaba cv. Pedro Sato não apresenta atividade de poligalacturonases (LINHARES et al., 2007), ou esta é muito baixa e diminui com o amadurecimento (LIMA, 2004; XISTO, 2002). Segundo Abreu (2010), a rápida diminuição da firmeza permanece inexplicável. Tal fato objetivou a pesquisa da esterase como possível enzima envolvida no processo de diminuição da firmeza da goiaba durante o amadurecimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedência e colheita dos frutos

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

Extração e atividade enzimática

A extração da esterase da polpa fresca foi feita em almofariz e pistilo utilizando tampão fosfato 0,22 Mol.L⁻¹ pH 6,5 na proporção de 1:4 (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000xg por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante (S1) constituiu o extrato de esterase solúvel. O sedimento (SD1) contendo esterase de membrana foi novamente homogeneizado com o mesmo tampão na proporção de 1:4 (p/v) acrescido de Triton X-100 2%. Após 24 horas com agitações eventuais, foi centrifugado a 10.000xg por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante (S2) foi utilizado como esterase solubilizada. A atividade da esterase (U/g de polpa fresca) foi determinada utilizando alfanafilacetato como substrato.

Para a realização da eletroforese, a extração da esterase da polpa fresca foi feita em água destilada na proporção de 1:4 (p/v) com adição de polivinilpirrolidona insolúvel 2% (p/v) utilizando almofariz e pistilo. O extrato de esterase, que constitui o homogeneizado, foi centrifugado a 10.000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante constituiu o extrato de esterase solúvel. O sedimento contendo esterase de membrana foi novamente homogeneizado em tampão tris (0,025M) /glicina (0,2M) na mesma proporção acrescido de Triton X-100 2% (p/v), e após 24 horas sob agitações eventuais, centrifugado a 10.000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado como esterase solubilizada.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

Foi realizada eletroforese em cilindro com gel de poliacrilamida da esterase solúvel e a esterase solubilizada no quinto dia de amadurecimento, segundo Hedrick & Smith (1968). A separação eletroforética foi obtida com uma corrente constante de 2,5 mA por gel a 4°C. Os géis foram cortados em frações de 2mm de espessura com o auxílio de lâminas de aço e colocados em 200µL de tampão fosfato 0,22M pH 6,5. As frações permaneceram por 24 horas a 4°C antes de serem utilizadas no ensaio enzimático de esterase em cada fração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade da esterase no extrato aumentou linearmente com o amadurecimento da goiaba (Tabela 1). O mesmo comportamento foi também observado na fração solúvel (S1) e na fração de membrana (SD1), cuja soma recuperou $93 \pm 3,7\%$ da atividade do homogeneizado (Tabela 2 e Figura 1). As esterases de goiaba encontram-se predominantemente na membrana com uma média de $84 \pm 3,7\%$ da atividade contra $16 \pm 3,7\%$ na fração solúvel (Tabela 2). Com o tratamento da fração de membrana (SD1) com Triton X-100, $93 \pm 20\%$ da esterase foi solubilizada (Tabela 3), indicando que esta enzima está de alguma forma associada a membrana celular (proteína integrante ou periférica) das células da polpa da goiaba. Observou-se também um aumento relativo na enzima solúvel com o amadurecimento e uma correspondente diminuição da enzima de membrana (Figura 2).

Tabela 1-Atividade da esterase (mU/g de polpa fresca*)

| Dias | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 8 |
|-----------|---------|---------|--------|---------|----------|---------|----------|----------|
| Atividade | 780±294 | 970±237 | 750±98 | 840±109 | 1050±173 | 890±150 | 1000±115 | 1080±115 |

Os resultados são expressos como média±desvio padrão de 3 repetições contendo 3 frutos cada.

*Uma miliunidade foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 nanomol de α -naftol por minuto nas condições do ensaio.

Tabela 2-Atividade da esterase em mU/g de polpa fresca de esterases solúveis e de membrana

| Dias | Esterase solúvel (S1)* | % soma | Esterase de membrana (SD1)* | % soma | Soma (S1+SD1) | %recupera ção | |
|---------|---------------------------|----------|--------------------------------|--------|------------------|------------------|-----------|
| 0 | 72 ± 7 | 9 | 713 ± 68 | 91 | 785 ± 69 | 100 | |
| 1 | 68 ± 51 | 10 | 602 ± 67 | 90 | 670 ± 85 | 69 | |
| 2 | 112 ± 35 | 18 | 516 ± 38 | 82 | 628 ± 51 | 83 | |
| 3 | 110 ± 37 | 13 | 730 ± 81 | 87 | 840 ± 89 | 100 | |
| 4 | 145 ± 9 | 13 | 1012 ± 58 | 87 | 1157 ± 58 | 110 | |
| 5 | 137 ± 21 | 16 | 719 ± 168 | 84 | 856 ± 169 | 97 | |
| 6 | 153 ± 36 | 17 | 751 ± 62 | 83 | 903 ± 71 | 90 | |
| 8 | 200 ± 38 | 19 | 861 ± 166 | 81 | 1061±170 | 98 | |
| Média = | | 16 ± 3,7 | Média = | | 84 ± 3,7 | Média = | 93 ± 12,6 |

Os resultados são expressos como média±desvio padrão de 3 repetições contendo 3 frutos cada.

*Uma miliunidade foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 nanomol de α -naftol por minuto nas condições do ensaio.

Tabela 3-Atividade de esterase de membrana solubilizada com Triton X-100 (mU/g de polpa fresca*)

| Dias | Esterase de membrana | Esterase solubilizada | % de solubilização |
|------|----------------------|-----------------------|--------------------|
| 0 | 713 ± 68 | 374 ± 34 | 52 |
| 1 | 602 ± 67 | 547 ± 81 | 109 |
| 2 | 516 ± 38 | 538 ± 29 | 104 |
| 3 | 730 ± 81 | 621 ± 231 | 85 |
| 4 | 1012 ± 58 | 783 ± 92 | 77 |
| 5 | 719 ± 168 | 772 ± 144 | 107 |
| 6 | 751 ± 62 | 733 ± 127 | 98 |
| 8 | 861 ± 166 | 950 ± 121 | 110 |
| | | Média= | 93 ± 20 |

Os resultados são expressos como média±desvio padrão de 3 repetições contendo 3 frutos cada.

*Uma miliunidade foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 nanomol de α -naftol por minuto nas condições do ensaio.

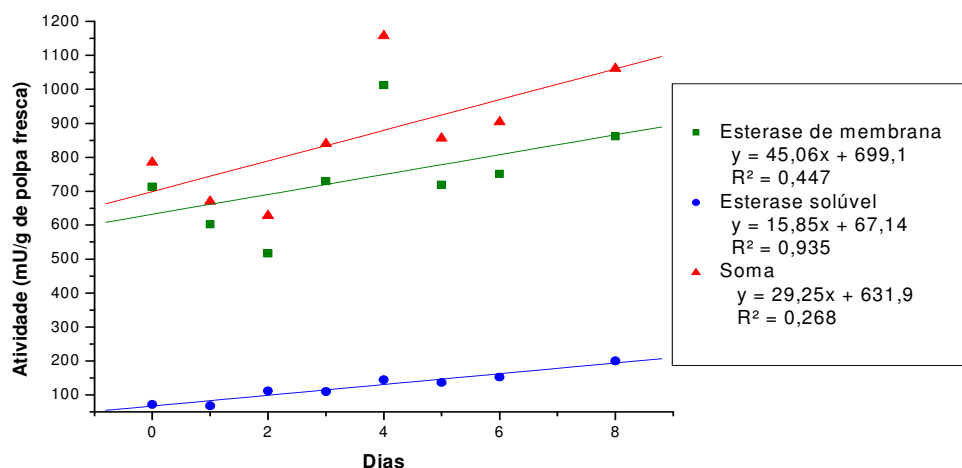


Figura 1 - Atividade em mU/g de polpa fresca da esterase solúvel (S1), de membrana(SD1) e do homogeneizado (S1+SD1).

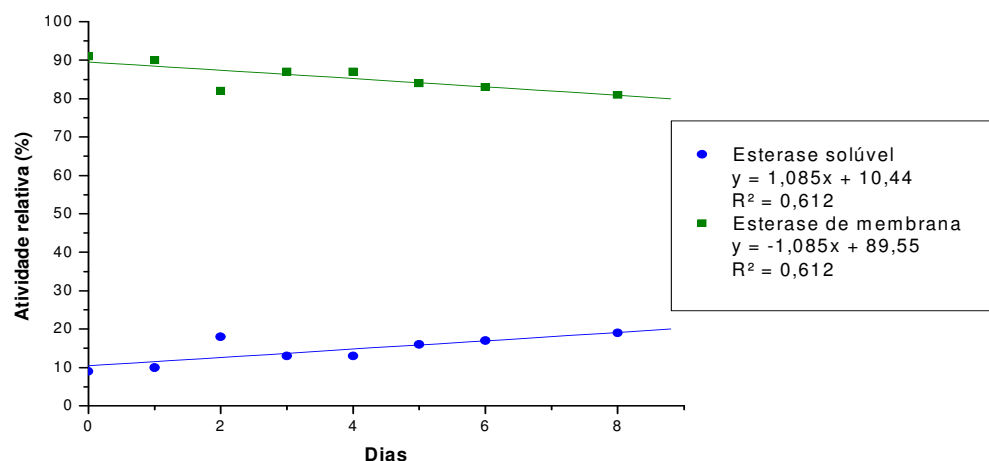


Figura 2 - Alteração relativa (%) da atividade da esterase com o amadurecimento.

A eletroforese da esterase solúvel e da esterase solubilizada com Triton X-100 estão representadas nas figuras 3 e 4 respectivamente. O perfil eletroforético da esterase solúvel no quinto dia de amadurecimento para um mesmo gel de poliacrilamida (Figura 3) foi determinado com duas concentrações de substrato (alfa-naftilacetato 4,46 mmol.L⁻¹ e 11,15 mmol.L⁻¹). Observou-se pelo menos 8 isoenzimas diferentes, das quais aquelas de maior mobilidade (4 picos) aumentaram muito sua atividade com o aumento da concentração de substrato (menor afinidade aparente pelo substrato), enquanto as isoenzimas de menor mobilidade não mudaram sua atividade com o aumento da concentração de substrato (maior afinidade aparente pelo substrato).

A eletroforese da esterase solubilizada por Triton X-100 (Figura 4) apresenta menos isoenzimas que a esterase solúvel e sua comparação com a esterase solúvel sugere que há um predomínio de isoenzimas com maior afinidade aparente pelo substrato.

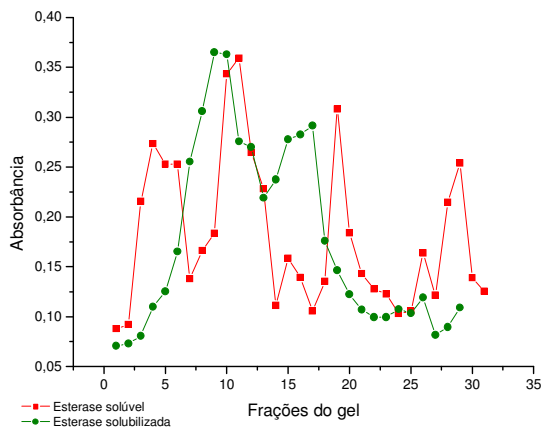


Figura 3 – Eletroforese em cilindro de gel de poliacrilamida 7,5% da esterase solúvel e de membrana de polpa de goiaba no 5º dia de amadurecimento

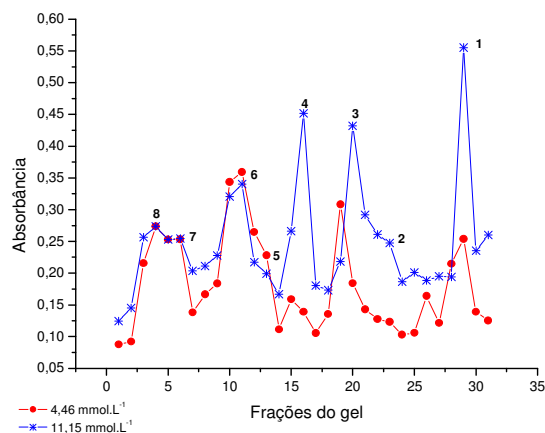


Figura 4 – Eletroforese em cilindro de gel de poliacrilamida 7,5% da esterase solúvel sob diferentes concentrações de substrato

CONCLUSÃO

- A atividade da esterase aumenta com o amadurecimento da goiaba.
- O aumento da esterase solúvel corresponde à diminuição da esterase de membrana.
- A esterase está predominantemente ligada à membrana celular e a sua solubilização com Triton X-100 sugere que ela seja integrante da membrana, embora a estabilidade da enzima na ausência de Triton X-100 possa contradizer esta hipótese.
- Existe pelo menos 8 isoenzimas esterásicas principais com atividades sobre o alfa-naftilacetato, das quais as quatro de maior mobilidade (1,2,3 e 4) apresentam menor afinidade aparente pelo substrato, quando comparado com a de menor mobilidade.
- As esterases de membrana apresentam mobilidade semelhante às 4 isoenzimas solúveis de menor mobilidade.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

Abreu, J. R. Santos, C. D.; Abreu, C. M. P.; Corrêa, A. D. **Amadurecimento de goiaba cv “Pedro Sato”**, 2010. 99 f. Dissertação (Doutorado em Agroquímica) – Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

CARVALHO, V.D. Qualidade e conservação pós-colheita de goiabas. **Informe Agropecuário**, v. 17, n. 179, p. 48-54, 1994.

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

DURIGAN, J.F. Colheita, conservação e embalagens. In: Simpósio Brasileiro sobre a cultura da goiabeira, 1., Jaboticabal, 1995. **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, 1997. P.149-158.

FERTONANI, H. C. R. **Estabelecimento de um modelo de extração ácida de pectina de bagaço de maçã**. 2006. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

HEDRICK, J.L. and SMITH, A.J. Size and charge separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, July 1968, vol. 126, no. 1, p. 155-164.

GONGATTI NETO, A.; GARCIA, A.E.; ARDITO, E.F.G. **Goiaba para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita**. Brasília: EMBRAPA, 1996. 35 p.

JAIN, N.; DHAWAN, K.; MALHOTRA, S.P.; SIDDIQUI, S.; SINGH, R. Compositional and enzymatic changes in guava (*Psidium guajava L.*) fruits during ripening. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.23, p. 357-362, 2001

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

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

LINHARES, L. A.; SANTOS, C. D.; ABREU, C. M. P.; CORRÊA, A. D. Transformações químicas, físicas e enzimáticas de goiabas “Pedro Sato” tratadas na pós-colheita com cloreto de cálcio e 1-metilciclopropeno e armazenadas sob refrigeração. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 829-841, 2007.

MAIA, G. A. et al. Técnica aumenta tempo de conservação da goiaba. **Revista Ciência e Tecnologia – FUNCAP**, v. 4, n. 1, p. 11-12, 2002.

MANICA, L.; ICUMA, I. M.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SALVADOR, J.O.; MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E. *Fruticultura Tropical Porto Alegre: Cinco continentes*, 2000. cap. 6. 373p:Goiaba.

Oliveira, A. C. G.; Zanão, C. F. P.; Aniceto, A. P.; Spoto, M. H. F.; Brazaca, S. G. C.; Walder, J. M. M. **CONSERVAÇÃO PÓS-COLHEITA DE GOIABA BRANCA KUMAGAI POR IRRADIAÇÃO**

GAMA: ASPECTOS FÍSICOS, QUÍMICOS E SENSORIAIS. B.CEPPA, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 375-396, 2006.

PEREIRA, F.M. & MARTINEZ, M. **Goiabas para industrialização.** Jaboticabal-SP. Ed. Legis Suma. 142 p., 1986.

PEREIRA, F.M. **Cultura da goiabeira.** Jaboticabal-SP. FUNEP. 47p., 1995.

SATO, A.C.K., CUNHA, R.L. & ARGANDOÑA, E.J.S. Avaliação da Cor, Textura e Transferência de Massa Durante o Processamento de Goiabas em Calda. **Braz. J. Food Technol.**, vol. 8: p. 149-156, 2005.

SIQUEIRA, E. B.; BRUSCATTO, M. H.; SGANZERLA, M.; BORGES, G. S. C.; ZAMBIAZI, R. C. **Aceitabilidade de goiabadas light com aplicação de hidrocolóides** - Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br>. Acesso em: 8 de julho de 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** (3ªed). Porto Alegre: Artmed. 2004. 719p.

TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. **Developments in Plant Genetics and Breeding I. Isoenzymes in Plant Genetics and Breeding.** Part B. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1983. 197p

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

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