

(S4-P90)

BIOQUÍMICA DA MATURAÇÃO DE FRUTOS DE UVALIA (*Eugenia pyriformis*)

MARISA APARECIDA DA FONSECA⁽¹⁾, LUIS CARLOS OLIVEIRA LIMA⁽²⁾,
CARLOS JOSE PIMENTA⁽²⁾ y NELSON DELU FILHO⁽²⁾

⁽¹⁾ Doutoranda, Dept. Ciência dos Alimentos – UFLA. C.Postal 3037
Lavras - MG, Brasil marisa@ufla.br

⁽²⁾ Prof. Depto. Ciência dos Alimentos – UFLA. C.Postal 3037
Lavras – MG, Brasil, 37200-000 icolima@ufla.br

⁽³⁾ Lab. Biotecnologia/UNINCOR
Três Corações – MG, Brasil 37410-000 ndelu2@ufla.br

Palavras chave: uvalha – enzimologia - metabolismo – enzimas pécnicas

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho avaliar a atividade de algumas enzimas envolvidas no processo de maturação de frutos e do conteúdo de açúcares e pectina em frutos de uvalha em 4 diferentes estádios de maturação (10, 20, 30 e 40 dias após a antese), coletados em Lavras-MG. Foram quantificadas na polpa as atividades das enzimas polifenoloxidase, poligalacturonase, pectinametilesterase e peroxidases em cada estágio de maturação dos frutos e os conteúdos de açúcares solúveis, redutores e pectina solúvel e total. Verifica-se uma variação em todos as características analisadas, com um aumento na atividade de todas as enzimas até o penúltimo estágio, sendo que normalmente aos 40 dias após a antese esses valores foram reduzidos. Verifica-se um aumento no conteúdo de açúcares solúveis e redutores em todos os estádios, enquanto a pectina total e solúvel apresentou uma variação semelhante à observada para as enzimas.

MATURATION BIOCHEMISTRY OF UVALIA (*Eugenia pyriformis*)

Keywords: uvalha - enzymology - metabolism – pectic enzymes

ABSTRACT

It was intended in this work to evaluate the activity of some enzymes involved in the maturation process of fruits and of the content of sugars and pectin of the uvalha in 4 different maturation stages (10, 20, 30, and 40 days after anthesis), collected in Lavras-MG. The activities of the enzymes polyphenoloxidase (PPO, EC 1.14.18.1.), polygalacturonase (PG, EC 1.2.1.15) pectinmethylesterase (PME, EC 3.1.1.11) and peroxidases (POD, EC 1.1.1.7) in each maturation stage of the fruits and the contents of soluble, reducing sugars, soluble and total pectin were quantified in the pulp. A variation was found in all the characteristics investigated, with an increase in the activity of all the enzymes to the penultimate stage, its being normally at 40 days after anthesis, those values were reduced. An increase was verified in the content of soluble and reducing sugars in every stage, whereas total and soluble pectin showed a variation similar to that observed for the enzymes.

INTRODUÇÃO

A *Eugenia pyriformis* é uma mirtácea arbórea nativa da região Sul do Brasil (Mattos, 1954), sendo encontrada desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, conhecida como uvalha, uvaia-do-mato e uvalheira. Produz frutos de cor alaranjada que podem ser consumidos *in natura*, na forma de sucos, geléias e doce em pasta (Andersen e Andersen, 1988) e apresentam umidade em torno de 90,7%, teor de vitamina C entre 33 a 39,52mg/100 g de polpa, 1,53% de acidez, sólidos solúveis de 7,5°Brix e relação SST/ATT de 4,90 (Carvalho, 1988; Donadio, 1997).

A qualidade dos frutos é atribuída a uma série de fatores, como tamanho, forma, firmeza e coloração da casca, que associados à composição físico-química da polpa, confere aos frutos e aos produtos deles obtidos as qualidades desejadas para aceitação definitiva no mercado.

A maturação de frutos é um processo que envolve o controle coordenado da atividade de várias enzimas envolvidas no referido processo, que promovem ao longo do tempo desde a alteração na coloração dos frutos até a redução na sua firmeza, características que interferem na qualidade final dos frutos e, conseqüentemente, no seu aproveitamento industrial ou para consumo *in natura*.

Nesse contexto, algumas enzimas como poligalacturonase, pectinametilesterase, peroxidase e polifenoloxidase desempenham importante função bioquímica na alteração de aspectos associados com alteração da cor e firmeza dos frutos e, por conseqüência, do sabor. Assim, sabe-se que o conteúdo e a composição de açúcares têm papel fundamental no sabor do fruto e também constituem indicadores do estágio de maturação dos mesmos (Carvalho, 2000).

O amadurecimento de frutos pode proporcionar maior doçura do fruto devido ao aumento nos teores de açúcares simples (AS) decorrentes de processo de biossíntese ou degradação dos polissacarídeos existentes nos frutos, apesar do consumo de uma parte desses constituintes pela oxidação respiratória (Cheftel e Cheftel, 1992). Além disso, essa alteração no conteúdo de (AS) pela hidrólise de polissacarídeos de reserva normalmente provoca alteração na qualidade textural do fruto, podendo chegar ao enrugamento da superfície e perda da aparência desejada (Vilas Boas, 1999).

Além dos carboidratos, as substâncias pécticas, depositadas na parede celular e atuando como material cimentante também são responsáveis pela definição da textura do frutos (Chitarra e Chitarra, 1990). Essas substâncias normalmente são derivadas do ácido poligalacturônico e ocorrem na forma de protopectina, ácidos pectínicos, ácidos pécticos, ácidos pécticos e pectinas.

Um grande número de enzimas pode atuar na degradação das substâncias pécticas, como a pectinametilesterase e poligalacturonase. A ação conjunta dessas enzimas promove a hidrólise de substâncias pécticas (pectina e ácido poligalacturônico), tornando a parede celular menos rígida, modificando a textura do fruto. Associado a essas duas enzimas tem sido verificado o papel da polifenoloxidase e das peroxidases (Passardi et al., 2004; Chutintrasria e Noomhorm, 2006).

Os objetivos desse trabalho foram o de verificar a variação na atividade das enzimas polifenoloxidase, poligalacturonase, pectinametilesterase e peroxidases ao longo do desenvolvimento de frutos de uvalha e quantificar os conteúdos de açúcares solúveis, amido e pectina total e solúvel na polpa desses frutos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidos frutos de uvalha aos 10, 20, 30 e 40 dias após a antese de diferentes plantas localizadas na zona rural do município de Lavras-MG. Após a colheita, os frutos foram imediatamente transportados para laboratório, onde tiveram sua polpa retirada e congelada em N₂ líquido e mantidos a -86°C até o momento de sua utilização. Foram tomadas a massa fresca de 10 frutos inteiros e destes, a massa fresca das respectivas polpas e sementes.

A polpa foi macerada em tampão fosfato 50 mM pH 6,0, a 4 °C, na proporção de 1 g para 5 mL de tampão, homogenizador de tecido (Tsummizer), por 3 minutos, seguida por centrifugação a 20.000 g por 15 minutos. Na seqüência, o sobrenadante foi coletado e utilizado para determinação da atividade das enzimas polifenoloxidase (PPO), poligalacturonase (PG), pectinametilsterase (PME) e peroxidases (POD), bem como do conteúdo de açúcar solúveis totais (AST), açúcares redutores (Muller, 1959), sendo a concentração de sacarose obtida pela diferença entre esses dois valores. O precipitado foi lavado três vezes no mesmo tampão e ao final foi ressuscitado em 5 mL de tampão fosfato 0,1 mmol/L, contendo 32% (p/v) de ácido perclórico e deixado a temperatura ambiente por 30 minutos, e na seqüência o sobrenadante foi utilizado para quantificação de AR, e calculada a concentração de amido. Os conteúdos de pectina total e pectina solúvel foram quantificados pelo método descrito por reportado por McCready & Mc Comb, (1952), e Bitter & Muir, (1962).

Os dados foram analisados por ANAVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O acúmulo de massa fresca em frutos de uvalha apresenta um padrão em forma de curva quadrática, sendo este padrão devido mais ao acúmulo na semente do que na polpa, pois esta apresenta um padrão de acúmulo linear ao longo do período analisado (Figura 1). Verifica-se que no último estágio o fruto já se encontrava em avançado estágio de maturação, sendo o estágio 4 considerado o ideal para consumo in natura ou então utilizado para confecção de doces e geléias (ANDERSEN & ANDERSEN, 1988).

As atividades da peroxidase e polifenoloxidase apresentaram padrões semelhantes os frutos avaliados (Figura 2), sendo que os valores obtidos para POD sempre foram superiores aos da PPO. As POD são consideradas enzimas bifuncionais que podem oxidar vários substratos na presença de H₂O₂ e também de outras espécies reativas de oxigênio (Passardi et al., 2004). O crescimento por alongação celular leva a um aumento irreversível no volume celular que ocorre junto com o relaxamento da parede celular, possivelmente pelo envolvimento de alguns mecanismos enzimáticos que promovem alterações nos polímeros de xiloglucana ou que atuam sobre as ligações de hidrogênio entre celulose e xiloglucanas (Cosgrove, 2001). As alterações na estrutura interna da célula também podem envolver as peroxidases e o conteúdo celular de H₂O₂ está relacionado com a alongação celular (Schopfer, 1994; Joo et al., 2001; Dunnand et al., 2003). A alongação resulta do balanço entre atividades de enzimas que envolvem ERO e aquelas que relaxam a parede celular, sendo que este balanço provavelmente é variável entre as espécies e órgãos de uma planta. A atividade da PPO nos frutos analisados aumentou até o 4º estágio analisado, diminuindo no último. A PPO é uma enzima que cataliza a hidroxilação de monofenóis a o-difenóis e sua oxidação a o-diquinonas (Mayer e Harel, 1979). A função da PPO em células vegetais tem sido discutida, estando relacionada ao escurecimento enzimático (Vamos-Vigyazo, 1981), mecanismo de defesa contra patógenos (Mello et al., 2006), sendo que sua atividade depende da espécie, cultivar, maturidade e idade. Sua distribuição também varia com partes de frutos e vegetais (Anosike e Ayaebene, 1981; Lee et al., 1990; Asemato et al., 1992; Amiot et al., 1995; Lourenco et al., 1992).

Embora as atividades da PG e PME tenham apresentado padrões semelhantes nos frutos analisados, a atividade da PME é muito maior que a da PG (Figura 3). As duas são enzimas da parede celular que catalisam a modificação da pectina e seu conseqüente desarranjo estrutural, contribuindo para o afrouxamento da parede celular, culminando na redução da firmeza do tecido vegetal (Villavicencio et al., 2004), sendo que o desarranjo da estrutura da pectina é requerido para eventos que envolvem a separação celular entre células adjacentes (Hadfield e Bennett, 1998), como abscisão (Taylor et al., 1990), o qual resulta da dissolução de paredes celulares de células adjacentes (Sexton e Roberts, 1982). A atividade da PME é o ponto chave no controle do arranjo e desarranjo da matrix pectínica (Willats et al., 2001), pela desesterificação de pectinas, o que resulta na ligação de moléculas de pectinas com íons cálcio, originando géis semi-rígidos (Willats et al., 2001), o que poderia produzir estruturas mais rígidas em frutos, como no caso da uvalha verificado neste trabalho (Figura 3). A redução na atividade de ambas enzimas, PG e PME, no último estágio de desenvolvimento dos frutos analisados pode ser devido a um avançado estado de maturação dos mesmos, como conseqüência já de um processo de senescência. Em frutos transgênicos a repressão antisense da PME resultou em decréscimo da degradação da pectina (Giovannoni, 2001), embora haja evidências de que a atividade da PME tenha pequena participação no amolecimento de frutos durante seu amadurecimento, mas afeta muito a integridade dos tecidos durante a senescência e características de processamento do fruto (Brummel e Harpster, 2001). De forma conclui-se que a perda de firmeza verifica visualmente nos frutos do último estágio de desenvolvimento analisado deve-se proporcionalmente mais à atividade da PG do que da PME.

Foram quantificados os conteúdos de AR, AST, sacarose e amido na polpa de frutos de uvalha em 5 estádios de desenvolvimento (Figura 4). Verifica-se um aumento nesses conteúdos até o 4 estágio para AR, AST e amido e a partir daí ocorre a estabilização desses valores, exceto para o amido que tem uma redução. Interessantemente, os valores obtidos para sacarose permaneceram praticamente constantes durante todo o período analisado. A queda verificada no conteúdo de amido no último estágio possivelmente se deve à sua degradação para formar açúcares solúveis, embora não haja correspondente incremento no conteúdo de AST, talvez devido à sua rápida utilização, pois frutos de uvalha possivelmente são climatéricos, o que eleva o consumo dessas substâncias devido à elevação da taxa respiratória na pré-senescência, fase que deve coincidir com o estágio 4 analisado (Figura 1). Tem sido relatado que os açúcares desempenham importante papel regulatório em diferentes órgãos das plantas superiores (Gibson, 2005), e que a sacarose, por exemplo, pode afetar temporalmente a expressão de certos genes (Bernier et al., 1993) e que o conteúdo de açúcares solúveis pode afetar a senescência (Paul e Pellny, 2003).

Nos frutos analisados verificou-se uma elevação do conteúdo de pectina total desde o 1 estágio até o último, enquanto a pectina solúvel permaneceu praticamente constante até estágio 3 (Figura 5), havendo a partir desse ponto acréscimos até atingir valores máximos no último estágio analisado. Por outro lado, a solubilização, reduziu do 1º ao 3º estágio, havendo acréscimos significativos a partir desse ponto até o último estágio analisado (Figura 5). Analisando conjuntamente os dados das Figuras 3 e 5, nota-se uma correlação entre as atividades da PG e PME com os conteúdos de pectina total nos frutos analisados, sugerindo uma dependência desses valores pela ação das enzimas mencionadas.

CONCLUSÕES

Conclui-se que as atividades das enzimas POD, PPO, PG e PME são afetadas pelo estágio de desenvolvimento de frutos de uvalha, o mesmo ocorrendo para os conteúdos de AR, AST e amido, contrariamente ao que ocorre para a sacarose, que não apresentou

variações nos conteúdos analisados considerando-se as condições deste trabalho. O estágio de desenvolvimento dos frutos também afetou os conteúdos de pectina total, pectina solúvel e solubilização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, O.; ANDERSEN, V.U. 1988. **As frutas silvestres brasileiras**. 2.ed. Rio de Janeiro: Edições Globo. 203p.
- ANOSIKE, E. O. e AYAEBENE, 1981 A. O. Purification and some properties of polyphenoloxidase from the yam tubers (*Dioscorea bulbifera*). *Phytochemistry*, 20(12), p.2625-2628.
- AMIOT, M. J., TACCHINI, M., AUBERT, S. Y. E OLESZEK, W.1995 Influence of cultivars, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v.43, p.1132-1137.
- AOAC **Official methods analysis of the association of official analytical chemistry**. 1992. Washington, DC. p.1015.
- ASEMATO, H.N., WELLINGTON, M.A., ODUTUGA, A.A. E AHMAD, M.H.1992 Effect of short-term storage on phenolic content, o-diphenolase and peroxidase activities of cut yam tubers (*Dioscorea* sp). *Journal of Science Food Agriculture*, v.60, p.309-312.
- BERNIER, G.; HAVELANGE, A.; HOUSSA, C.; PETITJEAN A. e LEJEUNE P. 1993. Physiological signals that induce flowering. *The Plant Cell*, v.5, p.1147-115.
- BRUMMELL, D.A., HARPSTER, M.H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, v.47, p.311-340.
- CARVALHO, P.R.N.1988. Análises de vitaminas em alimentos: manual técnico. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos. 108p.
- COSGROVE, D.J. 2001. Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant Physiology*, v.125, p.131-134.
- DONADIO, L.C. 1997. Study of some Brazilian Myrtaceae in Jaboticabal – SP. *Acta Horticulturae*, v.452, p.181-183.
- CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. 1990. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: ESAL/FAEPE. 320p.
- DUNAND, C. et al. 2003 Expression of a peroxidase gene in zucchini in relation with hypocotyl growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 805-811
- GIBSON, S.I. 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, v.8, p.93-102.
- GIOVANNONI, J. 2001. Molecular Biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.52, p.725-749.
- HADFIELD, K.A., BENNETT, A.B. 1998. Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiology*, v.117, p.337-343.
- JOO, J.H. 2001. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiology*, v.126, p.1055-1060.
- Mayer, A.M., Harel, E. Polyphenol oxidases in plants. 1979. *Phytochemistry*, v.18, p.193-215.
- LOURENCO, E. J., NEVES, V. A. e DA SILVA, M. A. 1992. Polyphenol oxidase from sweet potato: purification and properties. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v.40, p.2369-2373.
- MELO, G.A.; SHIMIZU, M.M. E MAZZAFERA, P. 2006. Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust, *Phytochemistry*, v.67, p.277-285.

- PASSARDI, F.; PENEL, C. e DUNAND, C. 2004. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, v.9, n.11, p.534-540.
- PAUL, M.J. e PELLNY, T.K. 2003. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany*, v.54, p.539-547.
- SCHOPFER, P.1994. Histochemical demonstration and localization of H₂O₂ in organs of higher plants by tissue printing on nitrocellulose paper. *Plant Physiology*, v.104, p.1269-1275.
- SEXTON, R., ROBERTS, J.A. 1982. Cell biology of abscission. *Annual Review of Plant Physiology*, v.33, p.133-162.
- TAYLOR, J.E., TUCKER, G.A., LASSLETT, Y., SMITH, C.J.S., ARNOLD, C.M., WATSON, C.F., SCHUCH, W., GRIERSON, D., ROBERTS, J.A. 1990. Polygalacturonase expression during leaf abscission of normal and transgenic plants. *Planta* 183, 133-138.
- VAMOS-VIGYAZO, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Critical Review Food Nutrition*, v.15, p.49-127.
- VILLAVICENCIO, L.E.; BLANKENSHIP, S.M. e YENCHO, G.C. 2004. Skin adhesion in sweetpotato and its lack of relationship to polygalacturonase and pectinmethylesterase during storage. *Postharvest Biology and Technology*, v.32, p.183-192.
- WILLATS, W.G.T., MCCARTNEY, L., MACKIE, W., KNOX, J.P. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, v.47, p.9-27.

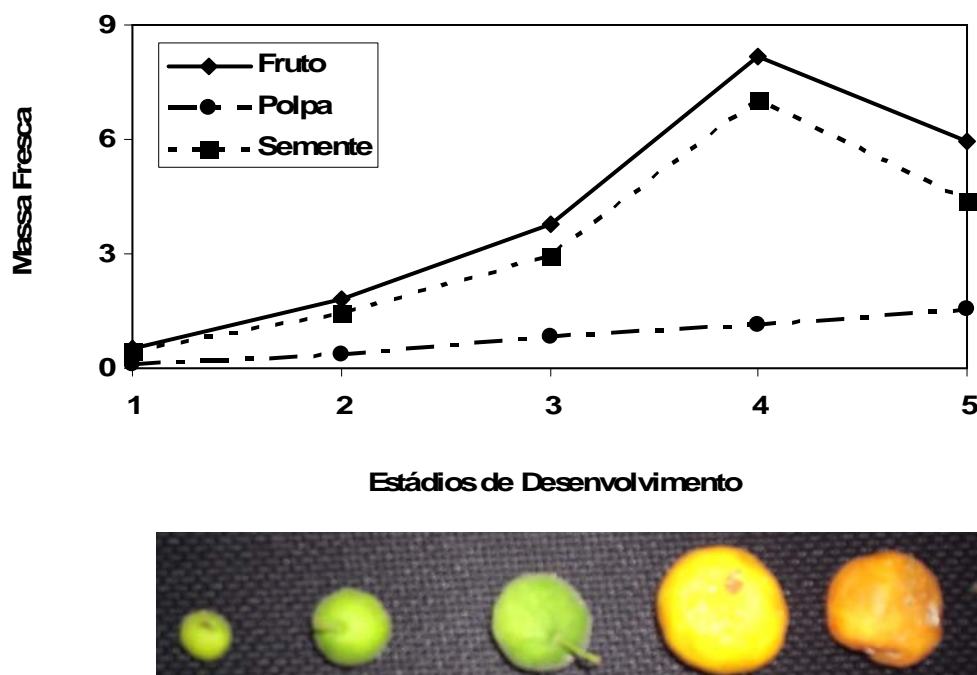


Figura 1: Acúmulo de massa fresca em frutos de uvalha em diferentes estádios de desenvolvimento

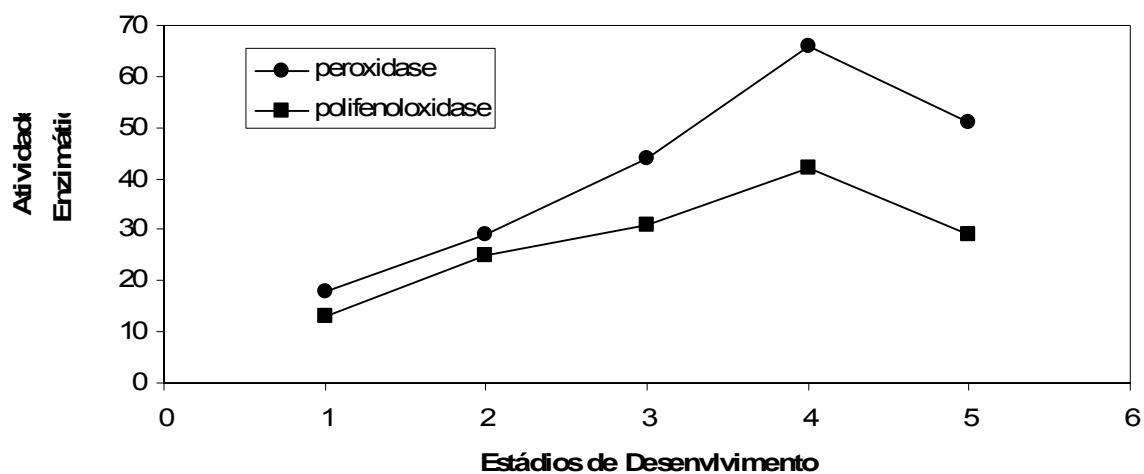


Figura 2: Atividade enzimática da peroxidase e da polifenoloxidase na polpa de frutos de uvalha em diferentes estádios de maturação (médias de 3 repetições).

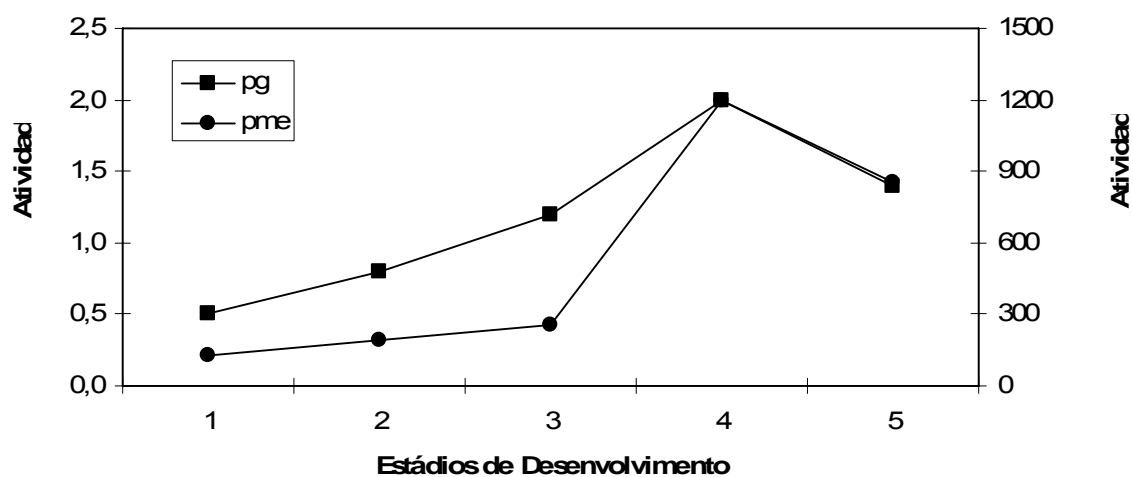


Figura 3: Atividade enzimática da poligalacturonase (pg) e da pectinametilesterase (pme) na polpa de frutos de uvalha em diferentes estádios de maturação (médias de 3 repetições).

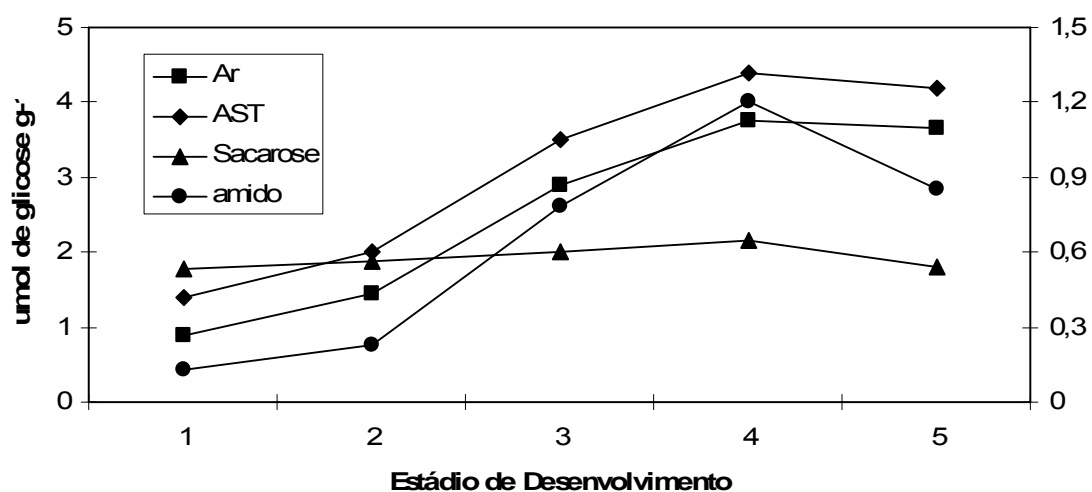


Figura 4: Variação nos conteúdos de açúcares redutores (Ar), açúcares solúveis totais (AST), sacarose e amido na polpa de frutos de uvalha em diferentes estádios de maturação (médias de 3 repetições).

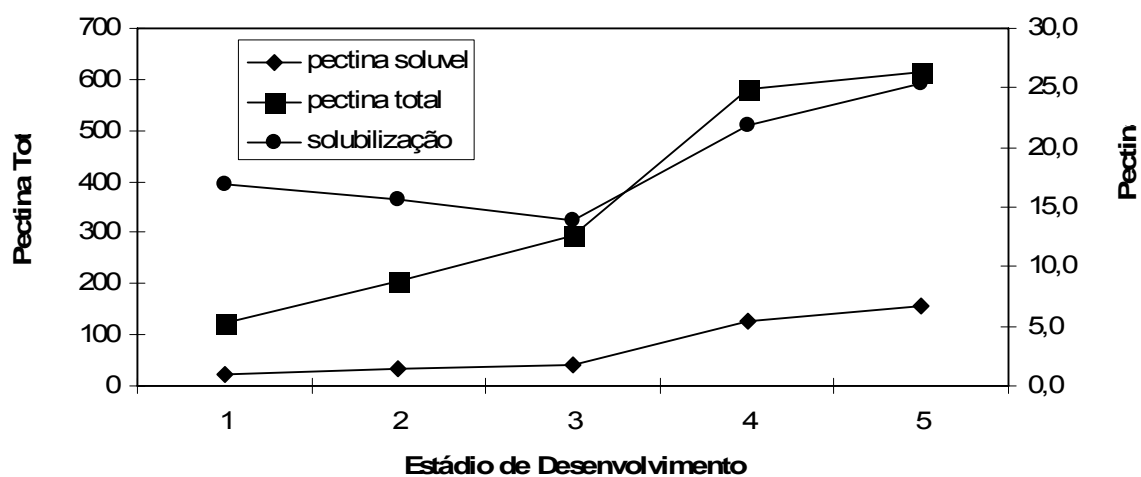


Figura 5: Variação nos conteúdos de pectina total, pectina solúvel e solubilização na polpa de frutos de uvalha em diferentes estádios de maturação (médias de 3 repetições).