

Avaliação das variações no tempo de relaxação da água em bananas durante o amadurecimento

Introdução

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de baixa resolução é uma técnica amplamente utilizada para investigar as propriedades físico-químicas da água em tecidos vegetais (RAFFO et al., 2005). As análises são baseadas em medidas de tempos de relaxação transversal (T_2) e longitudinal (T_1) e no coeficiente de autodifusão (D). Recentemente, Raffo et al. (2005) analisaram o tempo de relaxação transversal (T_2) e o coeficiente de autodifusão (D) da água em fragmentos de bananas (~ 600 mg) durante um período de armazenamento de sete dias. Os autores relataram três tempos de relaxação T_2 . O T_2 mais curto (T_{2pc}) foi associado como a água ligada às paredes celulares ou aos grânulos de amido. O valor de T_2 intermediário foi relacionado à água citoplasmática e o de T_2 mais longo a água vacuolar. Durante o período de sete dias de armazenamento os valores de T_2 atribuídos à água do citoplasma (T_{2cit}) e ao vacúolo (T_{2vac}) aumentaram gradualmente de 90 para 190 ms e de 320 para 610 ms, respectivamente. Os autores interpretaram esta tendência como sendo correlacionada com o desaparecimento dos grânulos de amido (de aproximadamente 18 % para 3%), que atuaria como um sítio de relaxação. Como estes grânulos estão presentes somente no citoplasma, os autores explicam o aumento de T_{2vac} propondo que a água nestes dois compartimentos estaria conectada pela difusão através de uma membrana. O desaparecimento do amido no citoplasma também contribuiria para o aumento do T_2 na água presente no vacúolo.

Neste trabalho analisamos o tempo de relaxação T_2 utilizando bananas intactas com o objetivo de eliminar o efeito de injúria nos resultados. Embora os resultados obtidos tenham sido similares aos obtidos por Raffo et al. (2005), propomos uma nova hipótese para o aumento dos valores de T_2 baseados na redução dos íons Fe^{+3} para Fe^{+2} .

Materiais e Métodos

As amostras de bananas foram coletadas ainda verdes e mantidas em uma sala refrigerada a 22 ± 1 °C. O grau de maturação foi determinado utilizando a escala de cores descrita por Loesecke (1950): estágio 1 = totalmente verde, estágio 2 = verde com traços amarelos, estágio 3 = mais verde do que amarelo, estágio 4 = mais amarelo do que verde, estágio 5 = amarelo com ponta verde, estágio 6 = totalmente amarelo e estágio 7 = amarelo com pontos marrons. Foram utilizadas seis bananas em cada experimento.

Nos experimentos utilizando bananas injuriadas, foi utilizado amassamento por compressão mecânica ou por congelamento por armazenamento a -20 °C por cinco horas.

Cinco soluções aquosas de ácido D(+)-Galacturônico/ Fe^{+3} , com razões molares variando de 0,5 a 200 vezes foram preparados pela dissolução do ácido em uma solução estoque de 3.6×10^{-4} Mol/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. O ácido D(+)-Galacturônico (Sigma-Aldrich) e o sal $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Mallinkrodt Chemicals) foram adquiridos em grau analítico. Água com alta pureza (Milli-Q Millipore) foi utilizada para a o preparar a solução estoque.

Os tempos de relaxação transversal (T_2) foram determinados utilizando a seqüência de pulso CPMG (BRAUN, 1998) em um aparelho de RMN com um campo magnético de 2.1 Teslas.

Foto: Fayene Zeferino Ribeiro



Autores

Fayene Zeferino Ribeiro,
Química, MSc., Graduada,
Universidade de São Paulo,
Instituto de Química de São Carlos,
Avenida Trabalhador São-Carlense 400,
São Carlos, SP, Brazil, 13560-590,
faylittelfay@yahoo.com.br

Lucinéia Vizzotto Marconcini,
Química, Pós-doutoranda, Dra.,
Embrapa Instrumentação
Agropecuária, C.P. 741,
CEP 13560-970, São Carlos, SP,
lu_vizzotto@yahoo.com.br

Lucio Leonel Barbosa,
Química, Pós-doutorando, Dr.,
Embrapa Instrumentação
Agropecuária, C.P. 741,
CEP 13560-970, São Carlos, SP,
luciolbarbosa@yahoo.com.br

Luiz Alberto Colnago,
Farmácia Bioquímica, Dr.,
Pesquisador,
Embrapa Instrumentação
Agropecuária, C.P. 741,
CEP 13560-970, São Carlos, SP,
colnago@cnpdia.embrapa.br

Resultados e Discussão

A Figura 1 mostra o efeito das injúrias causadas por amassamento (Fig. 1 a, b e c) e por congelamento (Fig. 2 d) na distribuição dos tempos de relaxação transversal (T_2). Os espectros foram obtidos pela transformada inversa de Laplace (ILT) dos dados de CPMG.

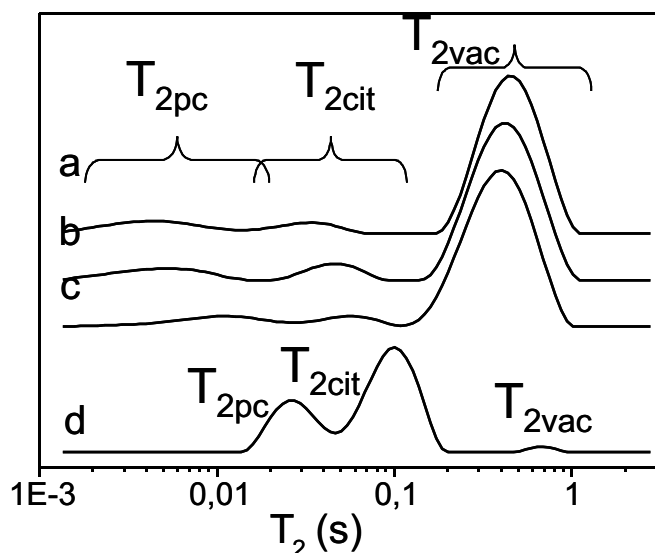


Fig. 1. Distribuição dos valores T_2 obtidos de bananas 'ouro' no estágio três de maturação, calculado pela ILT dos dados de CPMG. a) bananas intactas, b) e c) após 30 e 2 horas após injúria mecânica e d) banana após cinco horas de armazenamento a -20°C e 3 horas a 22°C .

Na Figura 1 pode ser observado que os valores de T_{2pc} e T_{2cit} aumentam com a injúria de 4 a 10 ms e de 30 a 70 ms, respectivamente, e que o T_{2vac} diminuiu de 450 para 400 ms (espectros de a a c), indicando o efeito da injúria mecânica no valor de T_2 . Este efeito é mais pronunciado nas bananas que foram injuriadas pelo congelamento (espectro d), os valores de T_{2pc} e T_{2cit} aumentaram de 4 a 25 e de 30 a 100 ms, respectivamente, e suas áreas aumentaram mais que 95% em relação à área total no espectro. Entretanto, o valor do terceiro pico de T_2 aumentou para 700 ms e sua área relativa foi reduzida a 5%.

O congelamento da água destrói as paredes celulares, permitindo que a água, inicialmente compartimentalizada no vacúolo, citoplasma e espaços intercelulares, se misturem após a amostra retornar a 22°C para as medidas de RMN (HILLS et al., 1997). Este fenômeno explica a redução da área do sinal da água vacuolar e o aumento dos outros sinais. Desta forma, a Figura 1 demonstra que a injúria pode alterar tanto os valores de T_2 como suas áreas relativas. Ela também indica a necessidade do estudo do processo de amadurecimento de bananas intactas, como proposto neste trabalho.

A Figura 2a apresenta a média e o desvio padrão dos valores de T_2 (T_{2pc} , T_{2cit} e T_{2vac}) obtidos para seis bananas 'ouro' intactas durante sete dias de amadurecimento. Os valores de T_{2pc} e T_{2cit} não variaram significativamente durante o amadurecimento, sendo os valores observados menores que os determinados previamente (RAFFO et al.,

2005). Entretanto, o aumento do valor do T_{2vac} de aproximadamente 400 ms (estágio 3) para 650 ms (estágio 7) é similar ao observado por Raffo et al. (2005) utilizando fragmentos de banana.

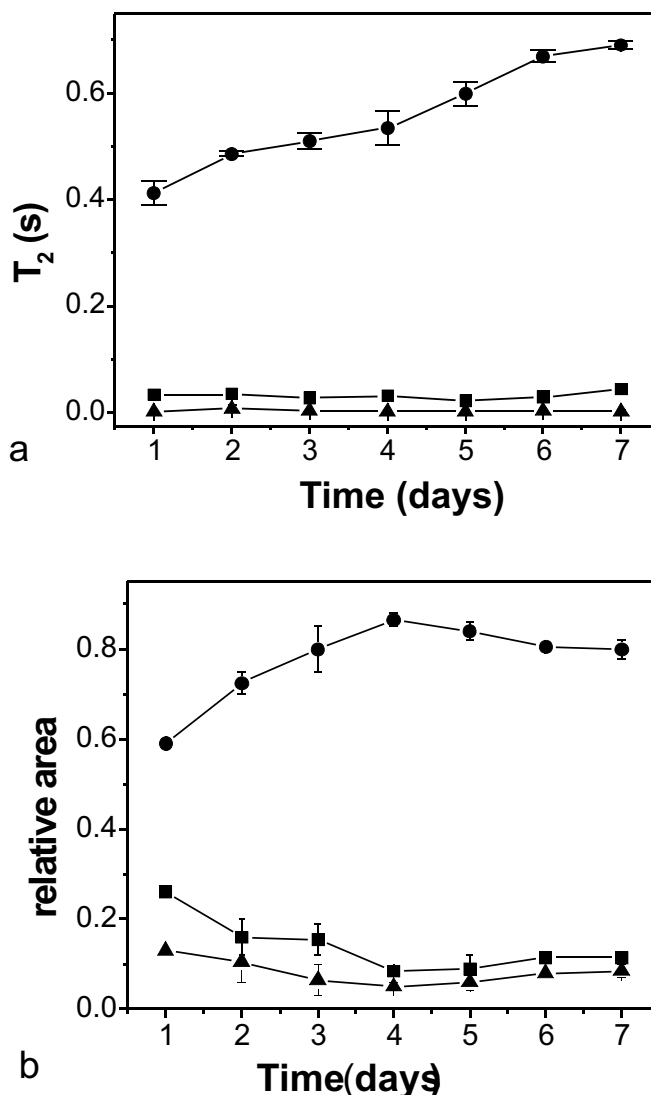


Fig. 2. Variação dos valores de T_2 (s) (a) e das áreas relativas (b) da água contida no vacúolo (●), no citoplasma (■) e nas paredes celulares (▲) em bananas intactas em função do tempo de armazenamento (dias).

Como nossas medidas foram realizadas com bananas intactas, foi possível eliminar o efeito das injúrias nos tecidos. Raffo et al. (2005) atribuíram o aumento do valor de T_{2vac} durante o amadurecimento devido o desaparecimento do amido no citoplasma. Entretanto, os grânulos de amido não estão livres no citoplasma, mas localizados em uma organela, o amiloplasto. Portanto, a água tem de se difundir entre três compartimentos: do vacúolo para o citoplasma, deste para o amiloplasto e finalmente retornar para o vacúolo, para que possa ser influenciada pelo amido. Assim, sugerimos que este mecanismo não é tão efetivo quanto proposto e apresentamos um novo mecanismo para a variação dos valores de T_2 .

Um dos mecanismos de relaxação que pode alterar o T_2 é a variação na concentração de espécies paramagnéticas

solução. Sabe-se que o tempo de relaxação do solvente é reduzido significativamente na presença de íons paramagnéticos, tais como Fe^{+3} , Cu^{+2} e Mn^{+2} , ainda que estejam presentes em concentrações muito baixas. Sabe-se também que bananas contêm íons de ferro, manganês e cobre (HARDISSON et al., 1998). Tais íons paramagnéticos podem reduzir o tempo de relaxação da água. A concentração de ferro na parte comestível na banana é maior que 2 mg/100 g (HARDISSON et al., 1998), o que pode diminuir o valor de T_2 da água livre em aproximadamente 0,2 s quando está em seu estado de oxidação de Fe^{+3} (Fig. 3). Estes valores estão dentro do intervalo de T_2 observados em bananas verdes.

Durante o amadurecimento, as pectinas são solubilizadas, alterando a textura do fruto e produzindo o ácido galacturônico (HGal), que pode reduzir íons Fe^{+3} a íons Fe^{+2} (DEIANA et al., 1989). Uma vez que a água na presença de Fe^{+2} possui um tempo de relaxação T_2 maior que na presença de Fe^{+3} , a redução de íons férricos para ferrosos pode ser o efeito dominante no aumento do tempo de relaxação da água conforme as bananas amadurecem.

Os efeitos no tempo T_2 da água causados pela redução dos íons férrico para ferroso pelo ácido galacturônico são mostrados na Figura 3. Esta Figura mostra que o aumento da razão HGal/ Fe^{+3} aumenta o valor de T_2 da água de cerca de 0,2 s para 0,7s. Embora seja possível detectar este efeito em aproximadamente cinco minutos após a mistura ser realizada, ele torna-se mais pronunciado após 48 horas. Nós sugerimos que uma redução similar dos íons Fe^{+3} para Fe^{+2} pelo ácido galacturônico produzido pela hidrólise da pectina é o principal mecanismo para o aumento de T_2 durante o amadurecimento de bananas.

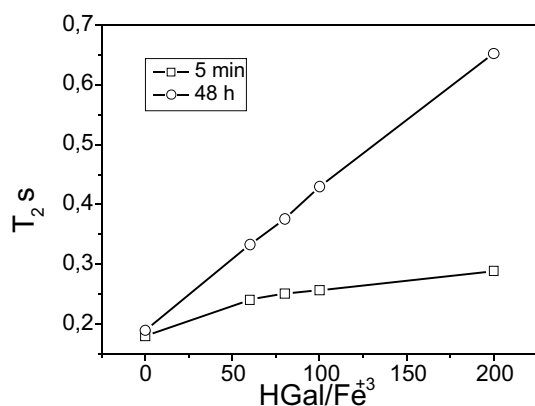


Fig. 3. Variação no tempo T_2 da água como uma função na relação entre ácido galacturônico e íons Fe^{+3} ($\text{Fe}^{+3} = 3,6 \times 10^{-4}$ mol) em (□) 5 min e (○) 48 horas após a preparação.

Conclusões

A partir dos resultados apresentados, concluímos que é necessário utilizar bananas intactas para a medida da variação de T_2 durante o amadurecimento, uma vez que as injúrias alteram seu valor. Também propomos uma nova interpretação para o aumento do valor de T_2 da água na parte comestível da banana durante o amadurecimento. Ela é baseada na redução do Fe^{+3} to Fe^{+2} por ácido galacturônico e é mais plausível do que proposta por Raffo et al. (2005).

Agradecimentos

Agradecemos as agências de fomento FAPESP, CNPq, CAPES e FINEP pelo suporte financeiro.

Referências

- BRAUN, S.; KALINOWSKI, H. O.; BERGER, S. **150 and more basic NMR experiments, a practical course**. 2nd expanded edition. Weinheim: Wiley-VCH, 1998.
- DEIANA, S.; GESSA, C.; SOLINAS, V.; PIU, P. SEEBER, R. Complexing and redox properties of the system D-galacturonic acid-iron(III). *J. Inorg. Biochem.*, New York, v. 35, n. 2, p. 107-113, 1989.
- HARDISSON, A.; RUBIO, C.; BAEZ, A.; MARTIN, M.; ALVAREZ, R.; DIAZ, E. Mineral composition of the banana (*Musa acuminata*) from the island of Tenerife. *Food Chem.*, London, v. 73, n. 1, p. 153-161, 2001.
- HILLS, B. P.; REMIGEREAU, B. NMR studies of changes in subcellular water compartmentation in parenchyma apple tissue during drying and freezing. *Int J Food Sci Technol*, Oxford, v. 32, n. 1, p. 51-61, 1997.
- LOESECK, H. W. **Chemical changes during ripening. Bananas chemistry, physiology and technology**. New York, EUA: Interscience, 1950. v. 4.
- RAFFO, A.; GIANFERRI, R.; BARBIERI, R.; BROSIO, E. Ripening of banana fruit monitored by water relaxation and diffusion $^1\text{H-NMR}$ measurements. *Food Chem.*, London, v. 89, n. 1, p. 149-158, 2005.

Circular Técnica, 47

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Instrumentação Agropecuária
 Rua XV de Novembro, 1542 - Caixa Postal 741
 CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: 16 2107 2800 - **Fax:** 16 2107 2902
e-mail: sac@cnpdia.embrapa.br
<http://www.cnpdia.embrapa.br>
1a. edição
 1a. impressão 2009: tiragem 300

Ministério da
 Agricultura, Pecuária
 e Abastecimento



Comitê de Publicações

Presidente: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Membros: Dra. Débora Marcondes B. P. Milori,
 Dr. João de Mendonça Naime,
 Dr. Washington Luiz de Barros Melo
 Valéria de Fátima Cardoso

Membro Suplente: Dr. Paulo S. P. Herrmann Junior

Expediente

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento das ilustrações: Valentim Monzane
Editoração eletrônica: Manoela Campos