

## Atividade da $\alpha$ -Galactosidase e $\alpha$ -Glicosidase Durante o Desenvolvimento do Fruto da Jaboticabeira (*Myrciaria cauliforme* Mart O. Berg)

Marcelo Murad Magalhães<sup>[1]</sup>, Herbert Cavalcante de Lima<sup>2</sup>, Patrícia de Fátima Ferreira Goulart<sup>3</sup>, José Donizeti Alves<sup>1</sup>, Luiz Carlos de Oliveira Lima<sup>4</sup>, Admilson Bosco Chitarra<sup>4</sup>

### Introdução

O curto período de vida pós-colheita da jaboticaba tem sido apontado como um dos fatores que dificultam a ampliação do consumo dessa mirtácea. Algumas mudanças durante o desenvolvimento do fruto já foram estudadas por Araújo et al. (2000), Barros et al. (1996), e Magalhães et al. (1996a ; 1996b). Em frutos, a perda de firmeza decorrente de processos fisiológicos tem sido atribuída à ação de enzimas hidrolases de carboidratos estruturais, que degradam principalmente pectinas e hemiceluloses. Lima et al. (2002) estudaram a atividade da pectinametilesterase da poligalacturonase na casca e polpa do fruto e relacionaram com a perda de firmeza no decorrer de diversos estádios de desenvolvimento. Verificaram que a firmeza dos frutos apresentou marcada redução no período estudado, estabilizando ao final do desenvolvimento (45 e 50 dias após a floração) enquanto o teor de pectina solúvel na casca e polpa aumentava. Os autores sugerem que a baixa atividade da poligalacturonase na casca e sua ausência na polpa, quando o fruto encontra-se com 45 (verde rajado) e 50 dias (maduro) após a floração, é indicativo que outras enzimas hidrolíticas devem atuar promovendo a despolimerização da fração pectínica da parede celular e lamela média do fruto. Vários estudos indicam que há evidências que a  $\alpha$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) e a  $\alpha$ -glicosidase (3.2.1.21) atuam durante o amadurecimento de frutos, promovendo amolecimento dos tecidos. Este trabalho teve por objetivo investigar a atividade dessas duas enzimas em 5 diferentes estádios de desenvolvimento do fruto, bem como purificá-la para posterior sequenciamento.

### Material e Métodos

Frutos foram colhidos em pomar doméstico localizado em Lavras-MG-Brasil, na safra de outubro/novembro de 2001. As análises foram realizadas na casca (exocarpo) e polpa (endocarpo) de frutos colhidos em cinco estádios: I . colhidos 35 dias após a floração (fruto verde), II . colhidos 45 dias após a floração (fruto imaturo mudando de cor, menos que 50% rajado), III . colhidos 47 dias após a floração (fruto imaturo mudando de cor, mais que 70% rajado) e IV . colhidos 50 dias após a floração (fruto maduro, cor escura) e V . colhidos 50 dias após a floração (fruto maduro, cor escura) e armazenados 3 dias em temperatura ambiente ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Os frutos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e todo o procedimento foi conduzido a temperatura de  $4^\circ\text{C}$ . No preparo do extrato bruto partiu-se de 30 gramas de polpa e de casca. O material foi homogeneizado por 2 minutos em politron com 40mL de tampão extrator PEG 8000 12% contendo 0,2% de metabissulfito de sódio, levado à centrifugação (17.000xg/30min), descartado o sobrenadante e lavado o resíduo com 40mL de água destilada. Repetiu-se centrifugação e lavagem por mais 2 vezes. O precipitado resultante foi ressuspenso com 80 mL de tampão acetato de sódio 0,1M com 1M NaCl, pH 4,5 e deixado sob agitação por 1 hora e em seguida centrifugado a 8.000xg/15min. O sobrenadante foi coletado, completado o volume para 100 mL e dialisado contra o tampão anterior por 48 horas. A reação enzimática deu-se na mistura composta de 0,4mL de solução BSA 0,1%, 0,4mL do correspondente substrato (*p*-nitrofenil derivado do  $\alpha$ -D-galactopiranosídeo ou  $\alpha$ -D-glicopiranosídeo, Sigma), 0,2-0,6mL de tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,5 e 0,2 a 0,6mL do extrato enzimático, resultando em um volume final de 1,6 mL. Antes da adição do extrato bruto, a mistura foi incubada a  $37^\circ\text{C}$  por 10min, adicionou-se então o extrato bruto e deixou-se sob atuação da enzima por mais 15 minutos. A reação foi paralisada com 2,0mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_2$  0,2M e o *p*-nitrofenol formado foi determinado em  $A_{415}$ . O resultado calculado utilizando-se curva padrão de *p*-nitrofenol (Sigma) e expresso como nmol *p*-nitrofenol formado por segundo por grama de matéria fresca ( $\text{nKat}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{mf}$ ). Para a purificação da  $\alpha$ -galactosidase, partiu-se de 300g de casca no estágio V (maduro), conforme procedimento descrito anteriormente. As proteínas

presentes no extrato bruto foram precipitadas em sulfato de amônio 2,8M e centrifugadas a 27.000xg/15min. O precipitado foi ressuspendido em 100mL de tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,6 e dialisado contra solução 1M de sulfato de amônio por 48 horas. A amostra foi aplicada em uma coluna Phenyl-Sepharose CL 6B (Pharmacia) equilibrada com solução de sulfato de amônio 1M sob fluxo de 90mL.h<sup>-1</sup>. Após aplicação da amostra, fez-se passar NaCl em gradiente que variou de 1M a 0,1M. As frações ativas foram dialisadas contra tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,6 concentradas por liofilização para 2mL e aplicadas em coluna pré-empacotada Sephacryl S-200 (Pharmacia), equilibrada com o mesmo tampão sob fluxo de 18mL.h<sup>-1</sup>. Em ambas as colunas, coletou-se frações de 6mL, fez-se leitura a A<sub>280</sub> e determinou-se a atividade da  $\beta$ -galactosidase. Na determinação de proteína total utilizou-se o método de Bradford, com padrão de BSA. A eletroforese em SDS-PAGE foi realizada na amostra desnaturada, de acordo com Laemmli (1970), utilizando o sistema minigel Bio Rad. Para confirmação da presença da  $\beta$ -galactosidase, fez-se um Western blot quimiluminescente, em membrana de nitrocelulose, utilizando anticorpo anti- $\beta$ -galactosidase (Sigma), e anti-coelho conjugado à peroxidase (Roche), de acordo com Towbin et al. (1979).

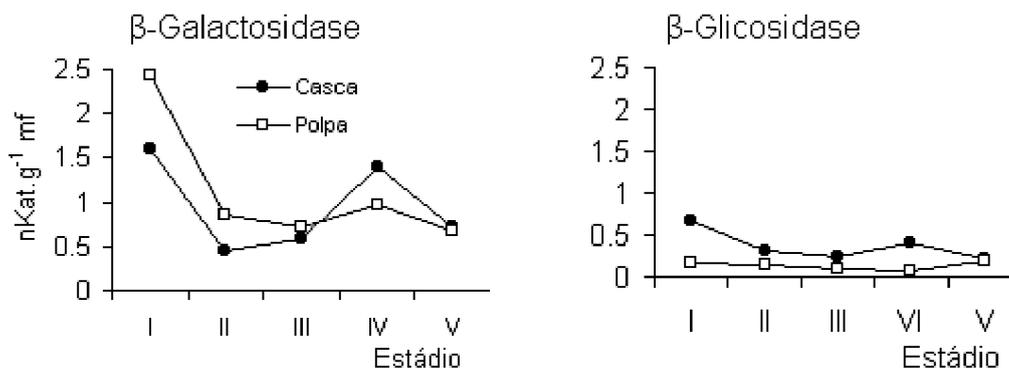
## Resultados e Discussão

A atividade da  $\beta$ -galactosidase em ambas porções apresentou elevada atividade no início do período estudado, decrescendo em seguida para então apresentar um pico que coincide com o estágio IV (momento em que o fruto encontra-se maduro), seguindo decréscimo até o final do período. O decréscimo da atividade na enzima no estágio V (fruto colhido maduro e armazenado em temperatura ambiente por 3 dias) sugere a ocorrência de reações catabólicas características de senescência (Tabela 1).

**Tabela 1.** Valores médios da atividade da  $\beta$ -galactosidase e  $\beta$ -glicosidase na casca e polpa do fruto da jaboticabeira em diferentes estádios (n=3). Lavras-MG: UFLA, 2001.

Estádio	$\beta$ -galactosidase (nKat.g <sup>-1</sup> )		$\beta$ -glicosidase (nKat.g <sup>-1</sup> )	
	casca	Polpa	Casca	Polpa
I	1.61 aB	2.44 aA	0.67 aA	0.17 bB
II	0.44 eB	0.86 cA	0.30 cA	0.15 bB
III	0.58 dB	0.72 dA	0.23 dA	0.11 cB
IV	1.39 bA	0.97 bB	0.41 bA	0.06 dB
V	0.72 cA	0.68 dA	0.21 dA	0.19 aA

Obs: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são estatisticamente iguais (5% Scott Knott).

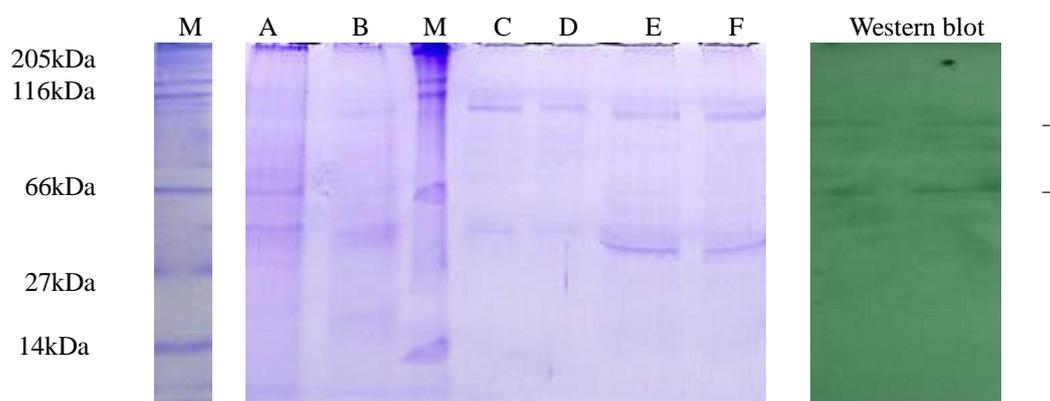


**Fig. 1.** Atividade da  $\beta$ -galactosidase e  $\beta$ -glicosidase em partes distintas de jaboticaba em desenvolvimento. Lavras-MG: UFLA, 2001.

A  $\alpha$ -galactosidase na casca apresentou comportamento semelhante ao verificado com a  $\beta$ -galactosidase, sendo que na polpa houve decréscimo até o estágio IV, quando então elevou-se significativamente no estágio V, o que indica que esta enzima possivelmente apresenta papel importante na degradação de carboidratos estruturais da polpa no período de senescência. Em todos os estádios, a  $\beta$ -galactosidase apresentou maior atividade que a  $\alpha$ -galactosidase (Fig. 1). Lima et al. (2002) verificaram que a poligalacturonase não apresenta atividade na polpa do fruto nos períodos correspondentes aos estádios III e IV do presente trabalho. A alta atividade da  $\beta$ -galactosidase nesse período é indício de que, possivelmente esta enzima possua um papel chave na despolimerização da fração pectina da parede celular do fruto. As colunas utilizadas demonstraram eficiência na purificação da enzima, resultando em um fator de purificação de 16 vezes (Tabela 2). A eletroforese em gel SDS-PAGE indicou a presença de duas isoformas da enzima no extrato purificado. Este resultado foi confirmado pelo Western Blot, que apresentou uma isoforma na faixa de 90 kDa e outra de peso molecular inferior na faixa de 60 kDa (Fig. 2).

**Tabela 2.** Etapas de Purificação da  $\beta$ -galactosidase. Lavras-MG: UFLA, 2002.

Passo da purificação	Proteína total (mg)	Ativ. Total (nKat)	Ativ. Espec. (nKat.mg <sup>-1</sup> pt.)	Fator de purificação	Recuperação (%)
Extrato bruto	378	53,50	0,14	1	100
Dialisado em NaPi 50mM	75,68	25,30	0,33	2,38	19,8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1,0M	67,43	89,30	1,32	9,43	17,6
Phenyl Sepharose CL 6B	1,96	3,34	1,70	12,14	0,51
Sephacryl S-200	0,67	1,28	2,24	16,00	0,15



**Fig. 2.** Eletroforese em SDS-PAGE e Western Blot de  $\beta$ -galactosidase desnaturada, extraída de casca de jaboticaba no estágio maduro (M=marcador, A=extrato bruto, B=extrato em 50mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dialisado, C e D=Sephacryl S-200, E e F=Phenyl Sepharose CL-6B. Lavras-MG: UFLA, 2001.

### Conclusão

A jaboticaba apresentou alta atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase na casca e polpa, o que indica que possivelmente esta enzima possua papel chave na perda de firmeza do fruto e contribua para desordens fisiológicas que levam à redução da vida de pós-colheita. O sistema cromatográfico adaptado

para purificação da  $\alpha$ -galactosidase foi efetivo para o isolamento da enzima, o que foi confirmado pelo western blot.

### Referências Bibliográficas

- ARAUJO, F.M.M.C.; LIMA, H.C.; CHITARRA, A.B. Alterações na composição química do fruto da jaboticabeira (*Myrciaria jaboticaba* berg cv. sabará) em diferentes estádios de desenvolvimento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17., 2000, Fortaleza. **Resumos**. Fortaleza: [s.n.], 2000. v.2.
- BARROS, R.S.; FINGER, F.L.; MAGALHÃES, M.M. Changes in non-structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, v.66, p.209-215, 1996.
- LIMA, H.C.; MAGALHÃES, M.M.; ARAUJO, F.M.M.C.; CHITARRA, A.B.; ECOLE, C.C. Firmeza, atividade da pectinametilesterase e Poligalacturonase e mudanças em carboidratos estruturais durante o desenvolvimento do fruto da jaboticabeira (*Myrciaria cauliforme*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, 2002. no prelo.
- MAGALHÃES, M.M.; BARROS, R.S.; FINGER, F.L. Changes in structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, v.66, p.17-22, 1996a.
- MAGALHÃES, M.M.; BARROS, R.S.; LOPES, N.F. Growth relations and pigment in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Journal of the Horticultural Science**, v.71, n. 6, p.925-930, 1996b.
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some application. **Proceedings of the National Academic of Science**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

---

[1] Professor Doutor, Departamento de Biologia - UFLA.

<sup>2</sup> Pesquisador da Embrapa/CPAA, doutorando em Ciência de Alimentos ó UFLA. [herberthot@hotmail.com](mailto:herberthot@hotmail.com).

<sup>3</sup> Professora, doutorando em Ciência de Alimentos ó UFLA.

<sup>4</sup> Professor Doutor, Departamento de Ciência de Alimentos - UFLA.