

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

ADELINE CHAICOUSKI MENEGUZZO

**PECTINAMETILESTERASE EM EXTRATO DO ALBEDO DE MARACUJÁ-
AMARELO (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)**

PONTA GROSSA
2014

ADELINE CHAICOUSKI MENEGUZZO

**PECTINAMETILESTERASE EM EXTRATO DO ALBEDO DE MARACUJÁ-
AMARELO (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Helene Giovanetti Canteri

Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Silva

PONTA GROSSA

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Meneguzzo, Adeline Chaicouski
M534 Pectinametilesterase em extrato do
 Albedo de Maracujá-amarelo (*Passiflora
 edulis* f. *flavicarpa*)/ Adeline Chaicouski
 Meneguzzo. Ponta Grossa, 2014.
 89f.

 Dissertação (Mestrado em Ciência e
 Tecnologia de Alimentos - Área de
 Concentração: Ciências e Tecnologia de
 Alimentos), Universidade Estadual de Ponta
 Grossa.

 Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Helene
 Giovanetti Canteri.

 Co-Orientador: Prof. Dr. Márcio Silva.

 1.Pectinametilesterase. 2.Extração.
 3.Maracujá-amarelo. 4.Liofilização.
 5.Atividade enzimática. I.Canteri, Maria
 Helene Giovanetti. II. Silva, Márcio.
 III. Universidade Estadual de Ponta
 Grossa. Mestrado em Ciência e Tecnologia
 de Alimentos. IV. T.

CDD: 664.8

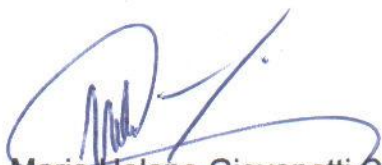
TERMO DE APROVAÇÃO

Adeline Chaicouski Meneguzzo

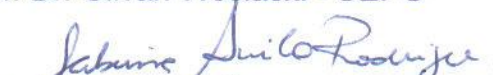
PECTINAMETILESTERASE EM EXTRATO DO ALBEDO DE MARACUJÁ-AMARELO (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)

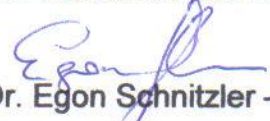
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador


Prof.ª Dr.ª Maria Helene Giovanetti Canteri - UEPG


Prof. Dr. Gilvan Wosiacki - UEPG


Prof.ª Dr.ª Sabrina Ávila Rodrigues - UTFPR


Prof. Dr. Egon Schnitzler – UEPG

Ponta Grossa, 14 de abril de 2014.

DEDICATÓRIA

À Isadora, meu tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo o que tem proporcionado nesta existência terrena, pelas pessoas que coloca em nossos caminhos, que contribuem para o nosso crescimento, e pela força nos momentos difíceis.

Agradeço à Professora Maria Helene Giovanetti Canteri pelo incentivo, e por aceitar orientar este trabalho, além de seu exemplo de profissionalismo, dedicação e amizade.

Agradeço ao Professor Dr. Márcio Silva pela co-orientação, que pelas suas sugestões muito contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Agradeço à Professora Neiva Deliberali Rosso, pelo auxílio e explicações que contribuíram com desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao meu esposo Isonel Sandino Meneguzzo, pelo apoio e incentivo para seguir em frente com os estudos.

Agradeço aos meus pais, Miguel e Reni, e aos meus irmãos.

Agradeço à Ana Luiza e Antonilda, exemplos de esforço e dedicação nos estudos.

Agradeço a todos aqueles que me ajudaram, tomando conta da Isadora, para que eu pudesse concluir minhas atividades.

Agradeço à Universidade Estadual de Ponta Grossa pela oportunidade de realizar o Mestrado.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa-auxílio durante o período da pesquisa.

Agradeço à Coordenação, ao corpo docente e colegas do Programa de Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, e à Denise Mendes, que muito me ajudou.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela cooperação na realização dos trabalhos.

Ao Laboratório de Purificação de Proteínas do Departamento de Química.

Agradeço também aos autores Brett Savary, Louise Wicker, Ahmet Yemenicioğlu e Luciana Konda, que prontamente responderam aos meus e-mails carregados de dúvidas.

Agradeço à Angélica F. Bertazzo, pela ajuda na finalização das análises.

Agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“É triste falhar na vida; porém, mais triste é não tentar vencer”.
“O único homem que não erra é aquele que nunca faz nada”*

Eleanor Roosevelt

RESUMO

As substâncias pécticas, carboidratos presentes na parede celular de vegetais, estão envolvidas na mudança da textura no processo de amadurecimento, sob atuação das enzimas pectinolíticas, dentre as quais a pectinametilesterase. A produção e o consumo do maracujá têm aumentado, indicando também aumento na quantidade de resíduos gerados, dentre os quais o albedo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade enzimática da pectinametilesterase em extrato bruto obtido do albedo de maracujá-amarelo. A sequência dos experimentos foi determinação do protocolo de extração da enzima e caracterização da atividade enzimática em extrato bruto obtido do albedo de maracujá-amarelo, quanto ao estágio de maturação, concentração de NaCl e substrato, período de armazenamento, pH e temperatura. Quando comparados os maracujás em estágio de maturação verde e maduro, fresco e liofilizado, o melhor resultado foi encontrado em amostras verdes liofilizadas. Dentre os cinco métodos de extração utilizados, dois deles se destacaram e foram adaptados, sendo realizada a tripla lavagem do material com água gelada para remoção de substâncias solúveis, seguida da extração da pectinametilesterase com PVPP e NaCl. A melhor concentração salina para maior atividade foi obtida com NaCl 1,0 mol L⁻¹, tanto na extração, quanto na determinação da atividade da pectinametilesterase. A melhor concentração de substrato encontrada foi 1,0 % de pectina cítrica. A influência do período de armazenamento da matéria-prima mostrou que o fruto liofilizado manteve a atividade enzimática por um período maior, seguido da amostra congelada e depois a refrigerada. O pH ótimo encontrado foi de 8 e a temperatura ótima de 50 °C. A enzima mostrou-se termoestável. A faixa ideal de precipitação com sulfato de amônio foi de 40-60 % do sal. Com os estudos realizados foi possível detectar e estudar a pectinametilesterase em extratos obtidos de amostras de albedo de maracujá-amarelo, com influência de vários fatores tais como concentração de NaCl e pH do meio.

Palavras-chaves: Pectinametilesterase; Extração; Maracujá-amarelo; Liofilização; Atividade enzimática.

ABSTRACT

The pectic substances, carbohydrates found in plant cell wall, are involved in the change of texture in the ripening process under action of pectinolytic enzymes, among which pectinmethylesterase. The production and consumption have increased the passion, also indicating an increase in the amount of waste generated, among which the albedo. The objective of this study was to evaluate the enzymatic activity of the crude extract obtained pectinametilaserase albedo yellow passion fruit. The sequence of experiments was to determine the extraction protocol of the enzyme and characterization of the enzyme activity in the crude extract obtained from the albedo of yellow passion fruit, as the stage of maturation, NaCl concentration and substrate storage time, pH and temperature. When comparing the level of passion fruit in green and ripe, fresh and lyophilized maturation, the best result was found in green lyophilized samples. Among the five extraction methods used, two of them stood out and were adapted, and made the triple rinsing the material with cold water to remove soluble substances, followed by extraction with pectinmethylesterase PVPP and NaCl. The best salt concentration for higher activity obtained with NaCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, both in the extraction, as in the determination of pectin methyl esterase activity. The best substrate concentration found was 1,0 % citrus pectin. The influence of the storage period of raw material showed that the freeze-dried fruit enzyme activity remained for a longer period, followed by the frozen sample and then refrigerated. The optimum pH was found to be 8 and the optimum temperature of 50 °C. The enzyme was heat-stable. The ideal range of precipitation with ammonium sulphate was 40-60 % of the salt. With the studies was possible to detect and study the pectinmethylesterase in extracts obtained from samples of albedo yellow passion fruit, with influence of various factors such as salt concentration and pH.

Key-words: Pectin methylesterase; Extraction; Passion fruit; Freeze drying; Enzymatic activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação da molécula de pectina; em destaque, monômeros de ácido galacturônico (A) e ácido galacturônico esterificado (B).....	19
Figura 2 - Esquema da disposição dos carboidratos (pectina, hemicelulose e celulose) na parede celular de plantas.....	20
Figura 3 - Três mecanismos de degradação das moléculas pécicas (1-Desesterificação com formação de metanol; 2-Despolimerização por hidrólise ácida; 3-Despolimerização por β -eliminação)	21
Figura 4 - Modelo esquemático para a estrutura básica da molécula de pectina.	22
Figura 5 - Esquema das fórmulas de pectinas de alto (a-HM) e baixo (b-LM) grau de metoxilação	23
Quadro 1 - Classificação geral de enzimas.....	25
Quadro 2 - Classificação das pectinases baseadas no modo de ação	26
Figura 6 - Interação dos íons Ca^{2+} com os grupos carboxílicos dos resíduos de duas moléculas de pectina.....	28
Figura 7 - Resumo da ação das enzimas Pectinametilesterase e Poligalacturonase sob a molécula de pectina durante a maturação dos tecidos vegetais.....	29
Figura 8 - Ação da Pectinametilesterase sobre a molécula de pectina de alta metoxilação, liberando metanol. Destaque para formação de carga negativa na molécula (Proporção de grupos esterificados nas moléculas em A=2:2; B=1:3)..	31
Figura 9 - Frutos de maracujá-amarelo (<i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i>)	35
Figura 10 - Coloração do flavedo das amostras de maracujás utilizadas. (A - predominantemente amarelo e B - predominantemente verde)	39
Figura 11 - Mudança da coloração na reação enzimática entre extrato contendo pectinametilesterase e pectina 10 g L^{-1} NaCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (20°C , pH 7,5, e indicador 0,04 %)	47
Figura 12 - Efeito da concentração de azul de bromotimol na atividade de pectinametilesterase em extrato bruto de albedo de maracujá a 620 nm (pH 7,5, pectina 10 g L^{-1} , NaCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, 20°C)	48
Figura 13 - Efeito da concentração de NaCl na extração de pectinametilesterase de maracujá-amarelo (pH 7,5, pectina 10 g L^{-1} NaCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, 20°C).....	56

Figura 14 - Efeito da concentração de NaCl no substrato utilizado na determinação da atividade de pectinametilesterase do extrato bruto de albedo de maracujá-amarelo (pH 7,5, pectina 10 g L ⁻¹ , 20 °C)	57
Figura 15 - Efeito da concentração de pectina na atividade de pectinametilesterase do extrato bruto do albedo de maracujá-amarelo (pH 7,5, NaCl 1,0 mol L ⁻¹ , 20 °C).	59
Figura 16 - Efeito do tempo de armazenamento da matéria-prima liofilizada na atividade da pectinametilesterase (pH 7,5, pectina 10 g L ⁻¹ NaCl 1,0 mol L ⁻¹ , 20 °C).	61
Figura 17 - Efeito do tempo do congelamento e da refrigeração da matéria-prima na atividade da pectinametilesterase (pH 7,5, pectina 10 g L ⁻¹ NaCl 1,0 mol L ⁻¹ , 20 °C).	62
Figura 18 - Atividade da pectinametilesterase em extrato obtido a partir do albedo de maracujá-amarelo mantido sob-refrigeração (pH 7,5, pectina 10 g L ⁻¹ NaCl 1,0 mol L ⁻¹ , 20 °C).	64
Figura 19 - Efeito do pH na atividade de pectinametilesterase de extrato bruto de albedo de maracujá-amarelo (pectina 10 g L ⁻¹ NaCl 1,0 mol L ⁻¹ , 20 °C).	65
Figura 20 - Efeito da temperatura na atividade de pectinametilesterase do extrato bruto de albedo de maracujá-amarelo (pH 7,5, pectina 10 g L ⁻¹ NaCl 1,0 mol L ⁻¹).	67
Figura 21 - Estabilidade térmica da pectinametilesterase do extrato bruto de albedo de maracujá-amarelo (pH 7,5, pectina 10 g L ⁻¹ NaCl 1,0 mol L ⁻¹) após 10 minutos de incubação.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características de pectinametilesterases obtidas de diferentes fontes vegetais	32
Tabela 2 - Sólidos solúveis totais (°Brix) obtidos da polpa das amostras de maracujás em dois diferentes graus de maturação	50
Tabela 3 - Comparação da atividade de pectinametilesterase em extrato bruto (U/min/mL) obtida do albedo do maracujá-amarelo por diferentes metodologias, grau de maturação (verde/maduro) e situação da amostra (fresca/liofilizada)	52
Tabela 4 - Atividade da pectinametilesterase extraída de maracujá-amarelo liofilizado, com grau de maturação verde, nas diferentes faixas de precipitação de proteínas através do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS	19
3.2 ENZIMAS	24
3.2.1 Considerações gerais.....	24
3.2.2 Enzimas pectinolíticas: Classificação e modo de ação	25
3.2.3 Atuação das pectinases na maturação e armazenamento de frutos.....	27
3.3 PECTINAMETILESTERASE	30
3.3.1 Características da pectinametilesterase.....	30
3.3.2 Extração e determinação da atividade da pectinametilesterase de tecidos vegetais.....	33
3.4 MARACUJÁ-AMARELO (<i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i>)	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 MATERIAL	39
4.2 MÉTODOS	40
4.2.1 Pré-processamento das amostras.....	40
4.2.2 Determinação do teor de sólidos solúveis totais (°Brix).....	40
4.2.3 Protocolo de Extração da Enzima Pectinametilesterase	41
4.2.4 Determinação da atividade da pectinametilesterase	43
4.2.5 Efeito das concentrações de NaCl na extração e na atividade da pectinametilesterase	44
4.2.6 Efeitos da concentração de substrato na atividade da pectinametilesterase em extrato bruto	44
4.2.7 Avaliação da atividade da pectinametilesterase em extrato bruto após período de armazenamento.....	44
4.2.8 Estudo do pH e da temperatura ótimos sobre a atividade enzimática da pectinametilesterase em extrato bruto.....	45
4.2.9 Estabilidade térmica da pectinametilesterase presente em extrato bruto	45
4.2.10 Precipitação da pectinametilesterase do extrato bruto com sulfato de amônio.....	46
4.2.11 Análise estatística	46

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PECTINAMETILESTERASE.....	47
5.2 PROTOCOLO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO COM ENZIMA PECTINAMETILESTERASE	50
5.3 EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE NaCl	55
5.4 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE DA PECTINAMETILESTERASE EM EXTRATO BRUTO	59
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA PECTINAMETILESTERASE EM EXTRATO BRUTO APÓS PERÍODO DE ARMAZENAMENTO.....	60
5.6 ESTUDO DO pH E DA TEMPERATURA ÓTIMOS	64
5.7 ESTABILIDADE TÉRMICA DA PECTINAMETILESTERASE PRESENTE EM EXTRATO BRUTO.....	68
5.8 PRECIPITAÇÃO DA PECTINAMETILESTERASE DO EXTRATO BRUTO COM SULFATO DE AMÔNIO	69
6 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS.....	72
ANEXOS	85
ANEXO A - Tabela de Precipitação com Sulfato de Amônio	86
ANEXO B - Técnica Bradford	88

1 INTRODUÇÃO

Enzimas, moléculas proteicas formadas por aminoácidos unidos por ligações peptídicas envolvidas nos processos bioquímicos, têm a função de catalisar reações, aumentando a velocidade com que elas ocorrem. São capazes de favorecer alterações estruturais em uma molécula, como a liberação de glucose do amido e a isomerização da glicose em frutose, assim como podem participar da síntese de moléculas específicas da parede celular por exemplo.

A pectinametilesterase – PME – responsável pela hidrólise do grupamento metoxil da molécula de pectina, liberando metanol, está presente na parede celular primária em células vegetais juntamente com celulose, hemicelulose e lignina, onde participam contribuindo com a firmeza dos frutos. Durante o crescimento, amadurecimento, armazenamento e processamento dos frutos, a pectinametilesterase, assim como as demais enzimas pectinolíticas, agem na cadeia de pectina, modificando a textura de tecidos vegetais. Do ponto de vista biológico, as enzimas pectinolíticas estão envolvidas também em interações fitopatogênicas, uma vez que o início do processo de infestação biológica começa por elas, as substâncias pécticas são mais acessíveis do que outras fibras no tecido vegetal. As enzimas pectinolíticas são utilizadas, principalmente, na clarificação de sucos de frutas, possibilitando o acabamento do produto.

O avanço do conhecimento sobre as características das pectinases é necessário em pesquisas relacionadas ao modo de ação destas enzimas visando uma aplicação industrial mais eficaz.

O maracujá tem sido estudado como alternativa de extração de pectina, porém há poucos estudos a respeito das enzimas que despolimerizam esta molécula, ou seja, das enzimas pectinolíticas presentes neste fruto. Percebe-se que a produção, bem como o consumo, do maracujá-amarelo tem aumentado a cada ano, o que também indica aumento da quantidade de resíduos gerados, principalmente da casca e do albedo, que na maioria das vezes é utilizado como adubo ou produção de ração.

Existem na literatura diversos trabalhos sobre a produção e as aplicações biotecnológicas das enzimas pectinolíticas, sendo a maioria referente às produzidas

por microrganismos. Atualmente têm-se estudado a pectinametilesterase de diferentes fontes vegetais, tais como cenouras, pepinos, vagens, laranja, pimenta, maçãs, peras, pêssegos, mamão, tomates, toranjas, morangos, caquis, bananas. Entretanto, não há trabalhos publicados referentes à extração da pectinametilesterase do albedo de maracujá-amarelo, apenas estudos relativos à atividade desta enzima no suco desta fruta, justificando, desta forma, a escolha do tema para esta pesquisa.

A extração e a quantificação da pectinametilesterase endógena de frutos é interessante quando se pretende estudar o efeito, por exemplo, da temperatura de ativação ou inativação num processo industrial. De acordo com informações da literatura sobre a extração enzimática, é importante o desenvolvimento de um método de extração e a otimização do mesmo para o fruto em estudo, em vez de apenas escolher um já estabelecido.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade enzimática da pectinametilesterase em extrato bruto obtido do albedo de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar o protocolo de obtenção de um extrato bruto com pectinametilesterase do albedo de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) por diferentes métodos.

Mensurar a atividade da pectinametilesterase em extrato bruto obtido do albedo fresco e liofilizado de maracujá-amarelo, em diferentes graus de maturação.

Avaliar o efeito das concentrações de NaCl e de pectina na atividade da pectinametilesterase .

Estudar a perda de atividade da pectinametilesterase do albedo de maracujá-amarelo armazenados sob diferentes condições de temperatura, bem como sua estabilidade térmica.

Verificar isoladamente o efeito do pH e temperatura sobre a atividade da pectinametilesterase em extrato bruto.

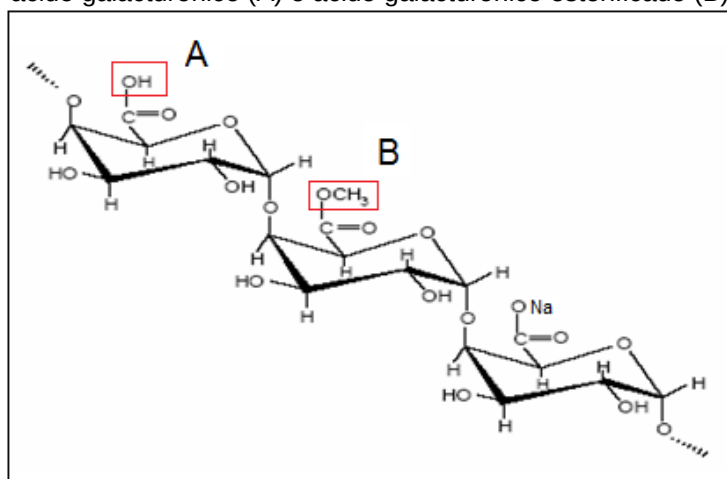
Testar a concentração salina na precipitação da pectinametilesterase em ensaios preliminares de purificação.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS

Substância péctica, um termo genérico que envolve um conjunto de polissacarídeos da lamela média da parede celular de vegetais, dentre os quais se destaca a pectina (REXOVÁ-BENKOVÁ; MARKOVIC, 1976). Tratam-se de moléculas ácidas complexas de alto peso molecular, (25 a 360 kDa), que se diferenciam entre os tipos de células, podendo ser encontradas na forma de ácidos pectínicos neutralizados com cálcio e magnésio (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). São importantes componentes dos tecidos vegetais, embora minoritários, (0,5 – 4 % do peso total das frutas) envolvidos na mudança da textura (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Figura 1 - Representação da molécula de pectina; em destaque, monômeros de ácido galacturônico (A) e ácido galacturônico esterificado (B).



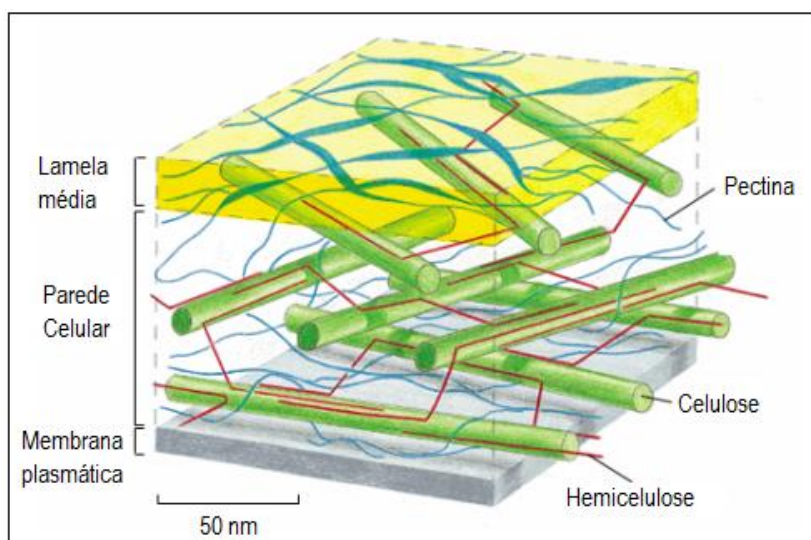
Fonte: HOURDET; MULLER, 1991.

As substâncias pécticas são classificadas de acordo com algumas características específicas (ALKORTA et al., 1998; KASHYAP et al., 2001; GUMMADI; KUMAR, 2005), são heteropolissacarídeos ramificados, onde a cadeia é formada por resíduos de ácido D-galacturônico (FIGURA 1A), esterificados com o grupamento metoxil (FIGURA 1B), e polimerizados por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$

(ROMBOUTS; PILNIK, 1980). O principal constituinte da cadeia das substâncias pécnicas é ácido D-galacturônico, porém quantidades variáveis de outros açúcares também podem ser encontradas, como D-galactose, L-arabinose, D-xilose, L-ramnose, L-fucose e 2-O-metilfucose (JARVIS, 1984; LEITÃO et al., 1995).

Pectina é um termo técnico que indica mistura de diferentes polissacarídeos ácidos compostos nos quais o ácido pectínico apresenta-se em maior quantidade. Pode estar interligada com outros polissacarídeos - celulose e hemicelulose – para estruturar a célula vegetal (Figura 2) (KASHYAP et al., 2001).

Figura 2 - Esquema da disposição dos carboidratos (pectina, hemicelulose e celulose) na parede celular de plantas.



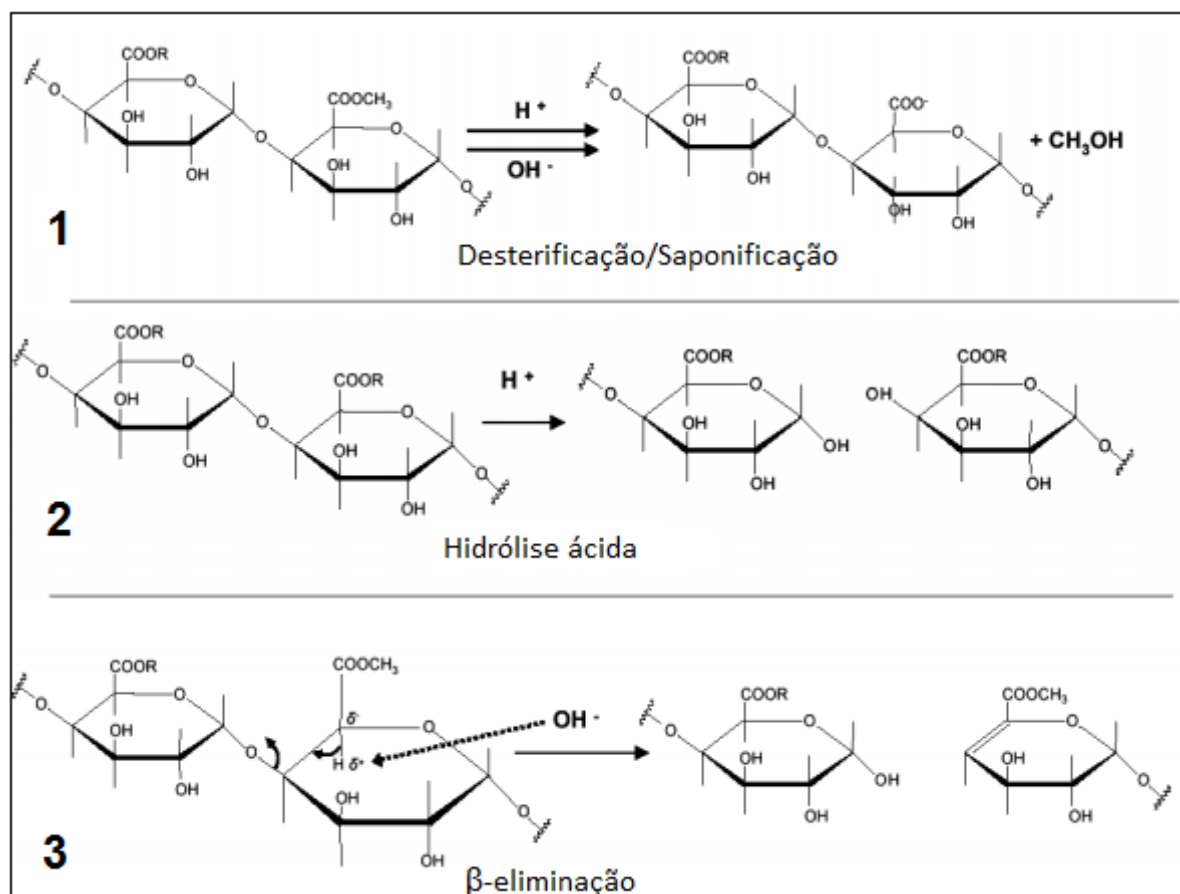
Fonte: MARTINS, 2006.

A pectina pode sofrer hidrólise por ação de álcalis e ácidos e por enzimas adequadas. A primeira etapa desta hidrólise é a remoção de grupos variáveis de metoxil, liberando ácido poligalacturônico, também chamado ácido pectico. Os vários componentes intermediários, ainda possuindo um número variável de grupamento metoxilas dão origem a um grande número de ácidos pectínicos. Na natureza não existem ácidos poligalacturônicos totalmente metoxilados ou sem metoxilas.

As substâncias pécnicas podem ser degradadas por meio de três mecanismos químicos distintos (Figura 3), o primeiro é a desesterificação, em que há liberação de metanol e a formação de pectatos. É um tipo de reação que predomina em meio ácido (pH 1.0 a 3.0), em temperaturas abaixo de 10 °C. O

segundo mecanismo é a despolimerização (diminuição da cadeia polimérica), por hidrólise (ácida ou enzimática) ou por β -eliminação das ligações $\alpha(1\rightarrow4)$. (THIBAULT; PETIT, 1979).

Figura 3 - Três mecanismos de degradação das moléculas pécicas (1-Desesterificação com formação de metanol; 2-Despolimerização por hidrólise ácida; 3-Despolimerização por β -eliminação).



Fonte: COLIN-HENRION, 2008.

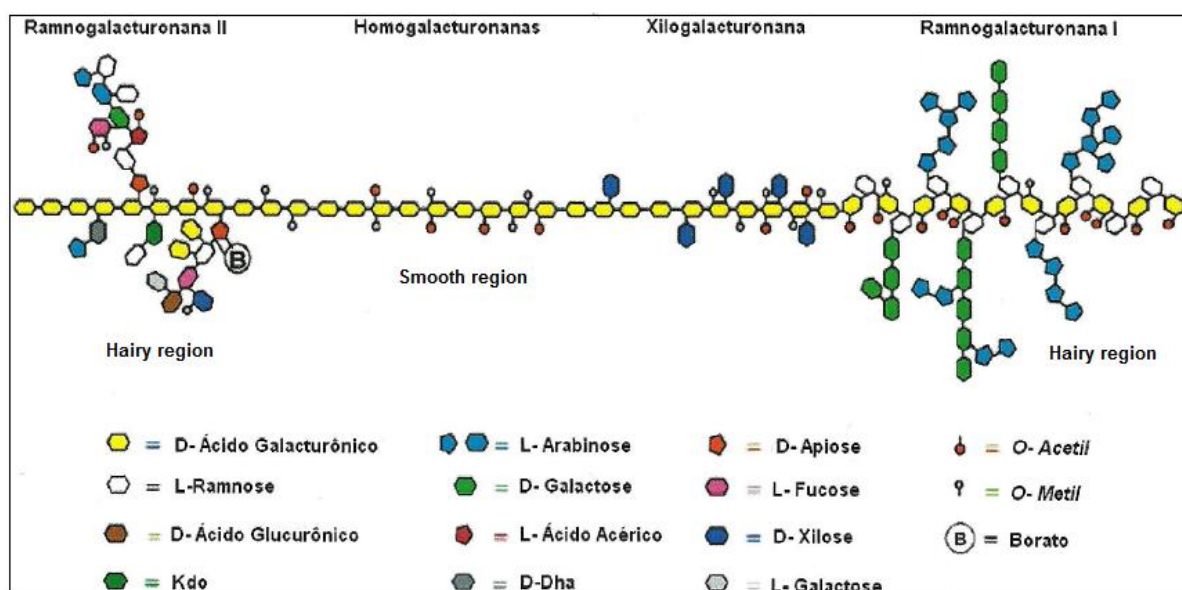
As substâncias pécicas de origens distintas apresentam características que contribuem com a singularidade de suas fontes e os principais responsáveis pela heterogeneidade destas substâncias, são grau de esterificação, a proporção de açúcares neutros e grau de polimerização (REXOVÁ-BENKOVÁ; MARKOVIC, 1976).

Na primeira metade da década de 30, as pectinas cítricas foram definidas como sendo de cadeias lineares de ácido galacturônico (VORAGEN et al., 2009), informação esta mantida até os dias de hoje. Com o desenvolvimento científico e

tecnológico obtiveram-se mais informações a respeito desta molécula, como por exemplo, são constituídas de monossacarídeos neutros e vários tipos de ligações para estabilização da sua estrutura (VINCKEN et al., 2003; VORAGEN et al., 2009).

Trata-se de uma estrutura que apresenta de 150 a 500 unidades de ácido galacturônico esterificados ou não com grupos metoxílicos, sendo uma cadeia molecular longa que apresenta ligação glicosídica $\alpha(1\rightarrow4)$. A estrutura da pectina consiste (Figura 4) em uma cadeia principal de unidades repetidas de ácido D-galacturônico unidas por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$, com regiões onde se ligam com unidades de $\alpha(1\rightarrow2)$ L-ramnose. Esses resíduos são locais para ramificação de cadeias laterais de outros polímeros de açúcares como xilose, galactose e arabinose (ALKORTA et al., 1998) e neutralizados por íons sódio, potássio ou amônio (KASHYAP et al., 2001).

Figura 4 - Modelo esquemático para a estrutura básica da molécula de pectina.



Fonte: Adaptado de SCHELER, et al., 2007.

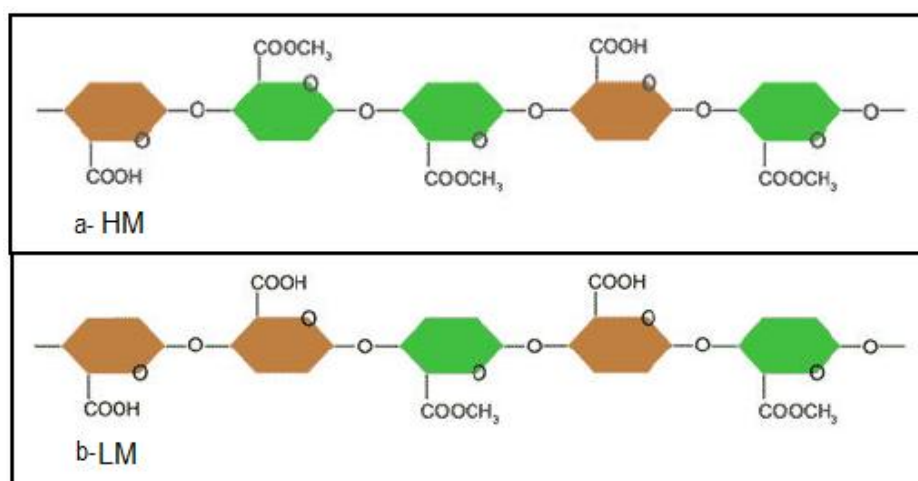
Segundo McNeil et al. (1984) e Scheller et al. (2007) pode-se definir a pectina como um grupo de polissacarídeos ácidos, de estrutura complexa, classificada em homogalacturonana (HGA), ramnogalacturonana I (RGI), ramnogalacturonana II (RGII), xilogalacturonana (XGA), arabinogalactana I e arabinogalactana II.

A pectina pode ser classificada de acordo com o seu grau de esterificação em alto e baixo grau de metoxilação (HM e LM, respectivamente – High e Low Methoxyl), segundo a proporção entre os grupos carboxil esterificados com grupos metoxil (HUISMANN; OOSTERVELD; SCHOLS, 2004).

O grau de esterificação da pectina e a distribuição dos resíduos esterificados ao longo da cadeia muda de acordo com o ciclo de vida da planta (HERRON et al., 2000), uma vez que o grau de esterificação é alterado por enzimas ao longo da maturação.

Para ser classificada como de alto grau de metoxilação é necessário que mais de 50 % de grupos carboxil estejam presentes na forma de metil éster, e menos de 50 % para ser considerada de baixo grau de metoxilação (Figura 5) (FU; RAO, 2001). As de alto grau formam gel em meio ácido com adição de açúcares, sendo assim a base de preparo de geleias, já as pectinas de baixo grau formam gel na presença de cátions divalentes, e sua principal utilização é no preparo de geleias dietéticas (ROSENBOHM et al., 2003).

Figura 5 - Esquema das fórmulas de pectinas de alto (a-HM) e baixo (b-LM) grau de metoxilação.



Fonte: IPPA, 2001.

Os teores mais elevados de pectina são encontrados principalmente em frutos cítricos, em geral no albedo, sendo que na laranja varia de 4 a 30 g/100 g de matéria úmida, no maracujá de 15 a 40 g/100 g de matéria úmida (BOBBIO; BOBBIO, 2001). As pectinas comerciais são obtidas somente a partir do albedo de frutas cítricas, 20 -

30 %, e polpa de maçã, 10 - 15 % (MAY, 1990; THAKUR; SINGH; HANDA, 1997). Outras fontes têm sido estudadas por apresentarem alto teor de pectina, como albedo de maracujá (CANTERI, 2010) e goiaba desidratada (MUNHOZ; SANJINEZ-ARGANDOÑA; SOARES-JÚNIOR, 2008).

A pectina, um hidrocolóide indispensável no preparo de geleias, em função de sua capacidade de formar gel, também apresenta características de espessante, emulsificante e estabilizante.

3.2 ENZIMAS

3.2.1 Considerações Gerais

As enzimas são moléculas proteicas com propriedades catalíticas, ou seja, são aceleradores de reações químicas, apresentam propriedades como alta conversão, especificidade para substrato e alta atividade em condições moderadas. Desta forma, a sua utilização como biocatalisador de processos é de interesse comercial (CASTILHO et al., 1996).

Somente a partir da segunda metade do século XIX é que as enzimas passaram a ser utilizadas em processos industriais (HOONDAL, 2002). A utilização de enzimas na indústria se deve à sua especificidade, estabilidade de armazenamento, atividade, disponibilidade e custo. A atividade enzimática depende tanto de sua concentração quanto da de seu substrato, e ainda da presença ou não de cofatores, efetores alostéricos, inibidores, potencial iônico, pH, temperatura, pressão e tempo de reação (BORRIS, 1987).

As enzimas comerciais podem ser obtidas tanto de fontes vegetais quanto animais ou ainda por fermentação (BORRIS, 1987). Dentre as enzimas mais estudadas destacam-se as pectinases, amilases, xilanases, celulasas e proteases, importantes em diversos processos industriais. A União Internacional de Bioquímica estabeleceu seis classes de enzimas, dependendo da forma de atuação (Quadro 1).

Quadro 1 - Classificação geral de enzimas.

CLASSES DE ENZIMAS		
Classe 1	Oxiredutases	Catalisam reações de oxiredução, transferindo elétrons, hidretos (H-) ou prótons (H+).
Classe 2	Tranferases	Transferem grupos químicos entre moléculas.
Classe 3	Hidrolases	Utilizam a água como receptor de grupos funcionais de outras moléculas.
Classe 4	Liases	Formam ou destroem ligações duplas, respectivamente, retirando ou adicionando grupos funcionais.
Classe 5	Isomerases	Transformam uma molécula em seu isômero.
Classe 6	Ligases	Formam ligações químicas por reações de condensação, consumindo energia sob a forma de ATP.

Fonte: FUNCIONAIS E NUTRACEUTICOS, 2012.

3.2.2 Enzimas pectinolíticas: Classificação e modo de ação

As pectinases, enzimas pécticas ou enzimas pectinolíticas são responsáveis por alterações nas moléculas das substâncias pécticas, por reações de despolimerização (hidrolases e liases) ou de desesterificação (esterases) (ROMBOUTS; PILNIK, 1980).

Devido às diferentes formas de pectina presentes nas células vegetais, são necessárias enzimas que atuem em regiões diferentes da molécula (GUMMADI; PANDA, 2003). Entre as enzimas pectinolíticas há uma classificação das enzimas de acordo com o substrato sobre o qual atuam (ácido péctico, ácido pectínico ou pectina), o modo de ação (transeliminação ou hidrólise), e como ocorre o rompimento das ligações glicosídicas, sendo que as do tipo endo clivam a cadeia de forma aleatória e as exo, a partir das extremidades não redutoras da cadeia (REXOVÁ-BENKOVÁ; MARKOVIC, 1976).

As pectinases são classificadas e nomeadas (Quadro 2) pela “Enzyme Comission” (E.C.), de acordo com recomendações da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) (GUMANDI; PANDA, 2003; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). As pectinases atuam complementando-se, e devido à diversidade estrutural apresentada pelas substâncias pécticas, apresentam diferentes mecanismos de atuação no substrato.

As despolimerases são enzimas capazes de romper as ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ entre os monômeros de ácido galacturônico das substâncias pécicas, agindo por hidrólise (hidrolases) ou por β -eliminação (liases) (KASHYAP et al., 2001; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

As esterases são divididas em pectinametilesterase (hidrolisa o metil ester formando ácido éctico e metanol) e pectinacetilesterase (hidrolisa o acetil ester da cadeia, formando ácido pécico e acetato). São produzidas pelos vegetais na maturação de frutos, crescimento vegetal e produção de pólen (BLANCO; SIEIRO; VILLA, 1999). Entretanto, microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras também podem sintetizá-las (HOONDAL et al., 2002). A pectinametilesterase é produzida por fungos, bactérias, leveduras e por vegetais superiores e fazem parte dos preparados comerciais.

Quadro 2 - Classificação das pectinases baseadas no modo de ação.

TIPO DE PECTINASE	E.C.	MODO DE AÇÃO	PRODUTO
ESTERASES (Desesterificantes)			
PME	3.1.1.11	Hidrólise	Ácido Pécico + metanol
PAE	3.1.1.6	Hidrólise	Ácido Pécico + etanol
DESPOLIMERASES			
a) Hidrolases			
Endo-PG	3.2.1.15	Hidrólise	Oligogalacturonatos
Exo-PG1	3.2.1.67	Hidrólise	Monogalacturonatos
Exo-PG2	3.2.1.82	Hidrólise	
Endo-PME		Hidrólise	
Exo-PMG		Hidrólise	
b) Liasas			
Endo-PL	4.2.2.2	Transeliminção	Oligogalacturonatos insaturados
Exo-PL	4.2.2.9	Transeliminção	Digalacturonatos insaturados
Endo-PNL	4.2.2.10	Transeliminção	Metiloligogalacturonatos insaturados
Exo-PNL		Transeliminção	

PME: Pectina metilesterase; PAE: Pectina acetilesterase; PG: Poligalacturonase;

PL: Pectato liase; PNL: Pectina liase; PMG: Polimetilgalacturonase;

Fonte: Adaptado de ALKORTA et al., 1998; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; YADAV et al., 2009.

As enzimas pectinolíticas vêm sendo utilizadas industrialmente desde os anos 1930 no processamento de vegetais e frutas (KASHYAP et al., 2001). Para comercialização as pectinases utilizadas são as de origem fúngica, principalmente as produzidas pelo fungo *Aspergillus niger* (BLANCO; SIEIRO; VILLA, 1999), embora outros microrganismos também têm sido pesquisados. A utilização comercial das pectinases está ligada principalmente à indústria alimentícia, sendo de destaque na clarificação de sucos de frutas e bebidas, facilitando a filtração e garantindo um maior rendimento (ALKORTA et al., 1998), retirando os constituintes que causam turbidez do suco, e no vinho tinto, melhora a cor e dá estabilidade ao produto. Em 2005, as pectinases microbianas representavam 25 % do total de enzimas empregadas nas indústrias de alimentos, com diversas aplicações, entre elas a extração e a clarificação de sucos, vinhos, fermentação de café, extração de óleo vegetal entre outros (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

As pectinases alcalinas são utilizadas, na indústria têxtil, para processar e degomar fibras, como o rami, o cânhamo, o linho e a juta, e no pré-tratamento de água residual com material péctico, porém sobre estas não há muitos relatos na literatura (HOONDAL et al., 2002). As pectinases ácidas são utilizadas na indústria de sucos de frutas e fabricação de vinho, no clareamento de sucos (maçã, pêssego e uva) e obtenção de sucos concentrados (sucos cítricos, de tomate e néctar) (KASHYAP et al., 2001).

Para que a pectina seja degradada em moléculas menores é necessária uma ação conjunta de várias enzimas, tanto na cadeia principal quanto nas ramificações (VRIES et al., 2002).

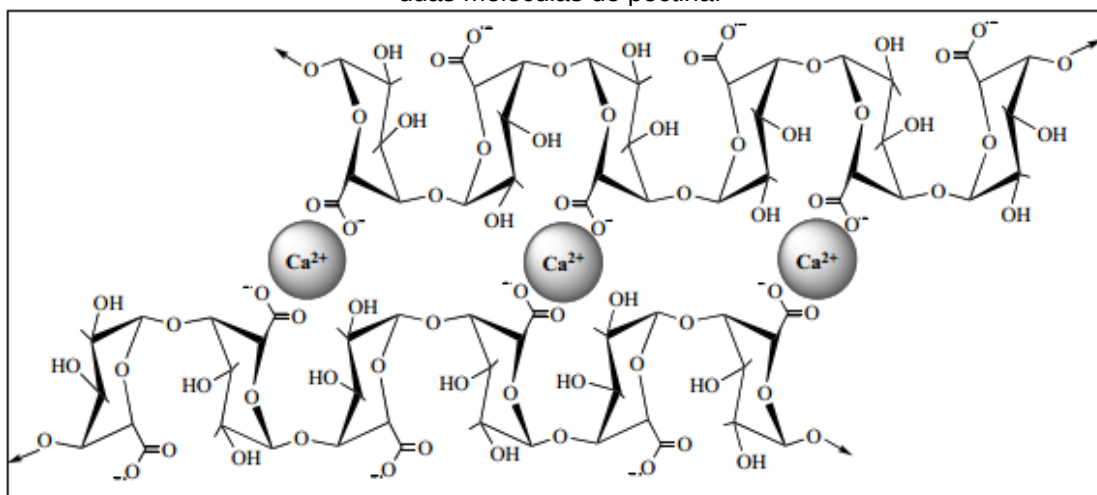
3.2.3 Atuação das pectinases na maturação e armazenamento de frutos

Em frutos imaturos, a pectina se une à celulose e garante a firmeza da parede celular, ou seja, a firmeza do fruto. À medida que os frutos amadurecem, a estrutura é alterada por ação enzimática, resultando no amolecimento dos tecidos vegetais (KASHYAP et al., 2001).

De forma resumida, o processo de amadurecimento de frutos pode ser descrito da seguinte maneira: quando os grupos carboxílicos ácidos encontram-se

ligados ao cálcio, formando pectato de cálcio (Figura 6), formam a pectina insolúvel, que predomina nos tecidos vegetais imaturos. À medida que amadurece ocorre a despolimerização da molécula com liberação do cálcio e solubilização da pectina, com formação de ácidos pectínicos, desmetilados pela pectinametilesterase, liberando então metanol e pectinas com alguns grupos metílicos (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Após a ação da pectinametilesterase sobre os ácidos pectínicos entra em ação a enzima poligalacturonase, responsável pela liberação de monômeros de ácido D-galacturônico (Figura 7).

Figura 6 - Interação dos íons Ca^{2+} com os grupos carboxílicos dos resíduos de duas moléculas de pectina.

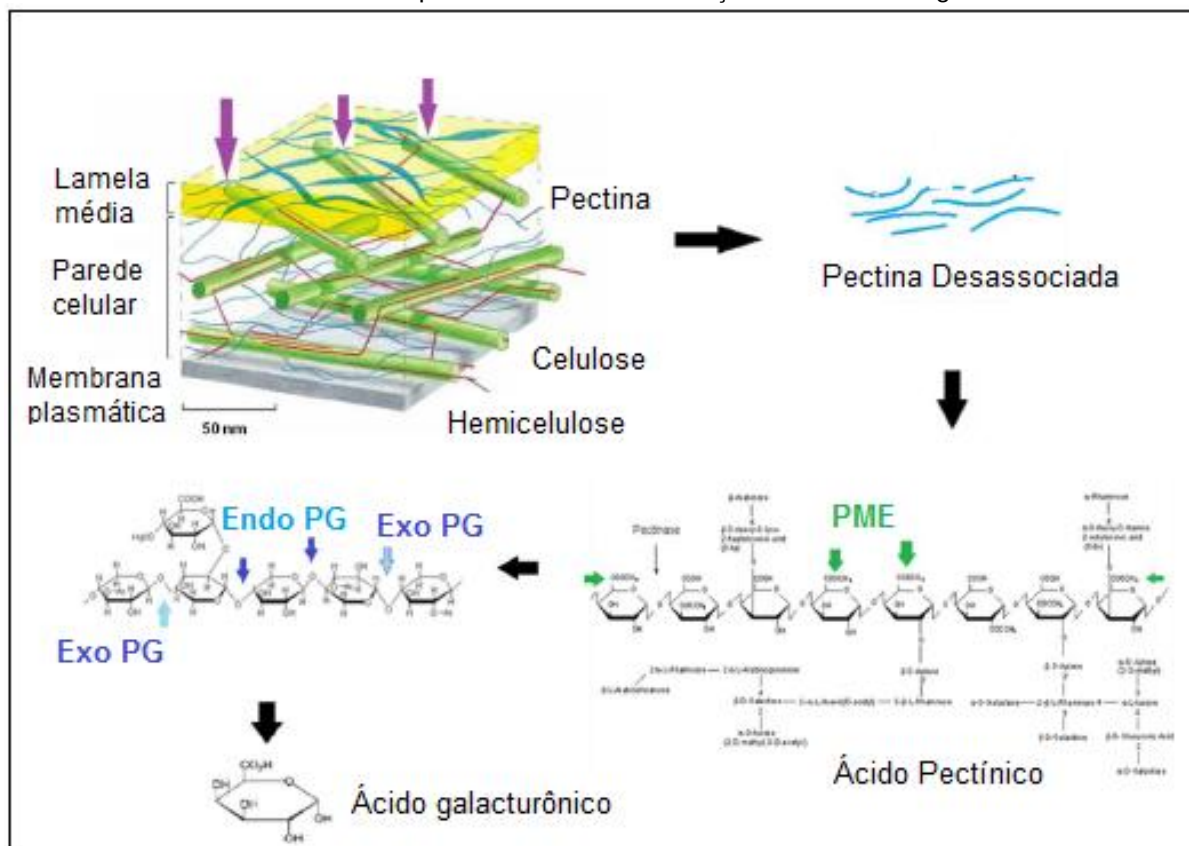


Fonte: VINCKEN et al., 2003.

A quantidade de metoxil da pectina cítrica diminui com o amadurecimento. As substâncias pécticas estão distribuídas em toda fruta, sendo a maior concentração na casca, flavedo e albedo, e uma menor quantidade no suco (ALKORTA et al., 1998).

De acordo com Pimenta, Chagas e Costa (2000), quando estudaram pectina e enzimas pectinolíticas em grãos de café em quatro estágios de maturação diferentes, concluíram que a maior atividade da pectinametilesterase está nos frutos verdes, e diminuem à medida que ocorre o amadurecimento, aumentando a solubilização de pectinas nos frutos maduros. Já, as poligalacturonase em frutos verdes apresentaram baixa atividade.

Figura 7 - Resumo da ação das enzimas Pectinametilesterase e Poligalacturonase sob a molécula de pectina durante a maturação dos tecidos vegetais.



PME: Pectinametilesterase; PG: Poligalacturonase.
 Fonte: Adaptado de Martins, 2006.

Thé et al. (2001) analisaram as modificações enzimáticas (PME e PG) em abacaxi em função da temperatura e estágios de maturação. Para este trabalho aplicaram planejamento experimental: estágio de maturação 2 (cor amarela não passando da metade da superfície do fruto) com e sem refrigeração, e estágio 3 (mais da metade da cor amarela) com e sem refrigeração. Concluíram que todas as enzimas analisadas estavam presentes nos frutos no ato da colheita, apenas pectinametilesterase não apresentou mudança na atividade pelo tipo de armazenamento, a poligalacturonase teve influencia do estágio de maturação, tipo de armazenamento e interação de ambos. Com exceção da poligalacturonase, também verificaram, elevada atividade das enzimas no estágio de maturação 3, armazenados sob refrigeração, o que pode significar que a baixa temperatura intensificou a atividade enzimática nos frutos mais maduros.

Antunes, Gonçalves e Trevisan (2006) verificaram em amora-preta, que a atividade da enzima pectinametilesterase aumenta durante o período de armazenamento. A enzima poligalacturonase aumenta somente após o início da ação da primeira. O armazenamento de mangas foi avaliado por Lima, Scalon e Santos (1996), e observaram que a atividade da enzima poligalacturonase aumenta após a diminuição da atividade da pectinametilesterase. A atividade de pectinametilesterase é maior em frutos ainda verdes, e diminui à medida que a amadurece e seca na planta. A perda de firmeza de carambolas, goiabas, bananas e mamão foi acompanhada por um aumento da atividade da pectinametilesterase (ALI et al., 2004). Ainda conforme estes autores as mudanças no amadurecimento podem ser ainda mais complexas, uma vez que há nos frutos isoformas da pectinametilesterase ou inibidores enzimáticos.

3.3 PECTINAMETILESTERASE

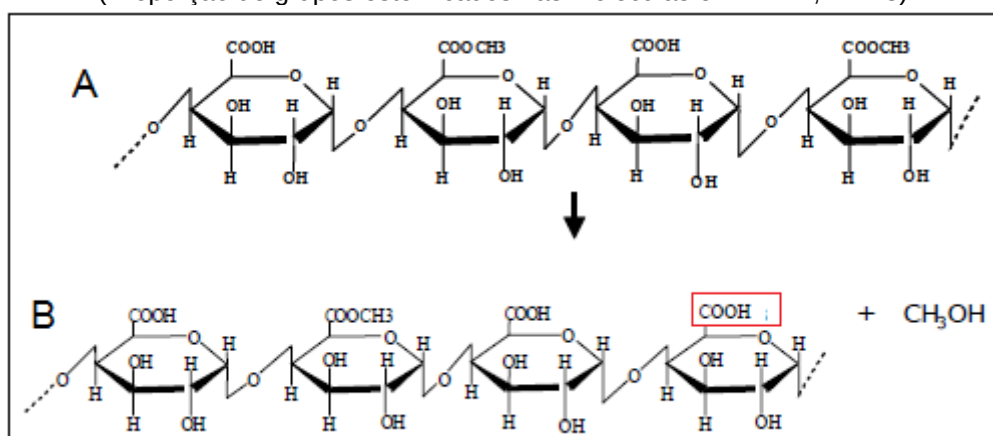
3.3.1 Características da pectinametilesterase

Dentre as enzimas pectinolíticas, as não despolimerizantes são a pectinametilesterase (PME) e pectinaacetilesterase (PAE), ambas são encontradas em todos os vegetais. Esta enzima desesterifica a pectina de alto grau de metoxilação, tornando-a de baixo grau de metoxilação (Figura 8) ou ácido péctico (pode ser hidrolisado pelas poligalacturonases) e durante a reação são formados grupos carboxilatos livres (COO^-), metanol (CH_3OH) (ROMBOUTS; PILNIK, 1980) e íons hidrônio (H_3O^+) (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Esta enzima está presente em preparados comerciais, com pH e temperatura ótimos na faixa de 4 a 8 e 40 a 50 °C, respectivamente (KAYSHAP et al., 2001; GUMANDI; PANDA, 2003; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). Apenas a sua ação não tem efeito sob a viscosidade de sucos (SANTI, 2005). Quando pectinametilesterase e poligalacturonase atuam, degradam a molécula da pectina alterando a textura, levando ao amadurecimento do fruto.

A ação da pectinametilesterase no amadurecimento é significativa, pois sua ação resulta no aparecimento de COO^- , o que reduz o grau de esterificação (convertendo a pectina em pectato - polímero não esterificado) e aumenta a densidade de cargas negativas na cadeia de pectina (BURNS; PRESSEY, 1987), e a afinidade por ligações com Ca^{2+} aumenta, formando uma estrutura gel agregada de poliuronídeos, que ficam sensíveis à ação da poligalacturonase. Quando as duas enzimas atuam, degradam a molécula da pectina alterando a textura, levando ao amadurecimento do fruto (PRESSEY; AVANTS, 1982; JARVIS, 1984; KLUGE et al., 2002).

Figura 8 - Ação da Pectinametilesterase sobre a molécula de pectina de alta metoxilação, liberando metanol. Destaque para formação de carga negativa na molécula. (Proporção de grupos esterificados nas moléculas em A=2:2; B=1:3).



Fonte: SANTI, 2005.

A pectinametilesterase pode ser ativada na presença de cátions mono e divalentes, sendo que cátions divalentes são de 5 a 20 vezes mais efetivos na ativação da pectinametilesterase do que os monovalentes. As concentrações ótimas de cálcio, entre 5 e 25 mmol L⁻¹, podem ativar a pectinametilesterase, porém, concentrações elevadas podem apresentar um efeito inibidor (REXOVA-BENKOVA; MARKOVIC, 1976).

Fontes et al. (2008) quando estudaram a ação enzimática no amadurecimento de duas variedades de mamão, concluíram que a atividade da pectinametilesterase pode variar entre os frutos durante o amadurecimento. Na cultivar Tainung, nos três primeiros dias da colheita a pectinametilesterase apresentou alta atividade, vindo a decrescer no 4º dia, seguida aumento, e a partir

do 7º e 8º dia após a colheita apresentou os menores valores. Na cultivar Sunrise Solo, a pectinametilesterase apresentou alta atividade no 1º dia, vindo a decrescer no 4º dia, revelou um aumento no 5º dia e só então estabilizou. A atividade enzimática da pectinametilesterase pode ser visualizada em todas as fases do desenvolvimento vegetal, porém a maior atividade é verificada em frutos imaturos, e no início da maturação (HARRIMAN; TIEMAN; HANDA, 1991; AZEVEDO, 2008).

Na Tabela 1 encontram-se de forma resumida algumas características referentes a pH e temperatura ótimos e estabilidade térmica de pectinametilesterase oriundas de diferentes fontes vegetais.

Em relação ao pH, pectinametilesterase de origem fúngica apresentam pH ótimo entre 4 e 6, já as de origem vegetal variam entre pH 7 a 9, assim como a pectinametilesterase microbiana. Em pH superior a 8, a atividade de pectinametilesterase pode não ser determinada com precisão sem a devida correção da desesterificação alcalina da pectina, fornecendo desta forma um melhor substrato para a ação de pectinametilesterase. Existe também a possibilidade de inativação da enzima em pH acima de 9 (MILLER; MACMILLAN, 1970).

Tabela 1 - Características de pectinametilesterases obtidas de diferentes fontes vegetais.

Fonte de PME	pH ótimo	Temperatura ótima	Estabilidade térmica*
Cereja (Isoformas)	I ₁ : 7,0 I ₂ : - I ₃ : < 5,2 I ₄ : 5,8	-	I ₁ e I ₃ são termoestáveis I ₂ e I ₄ são termoestáveis 100 % (1 min, 60-70 °C)
Cenoura	7,3-7,4	48,5	50 % (10 min, 55 °C) 5 % (10 min, 60 °C)
Acerola	9,0	-	125,5 % (90 min, 98 °C)
Morango	6,9-7,0	59-60	-
<i>Citrus reticulata</i>	9,0	-	20 % (1 min, 70 °C)
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.	7,0	50	-
Casca de laranja Valencia	9,0	-	-
Maçã	6,5-7,5	-	100 % (1 min, 40 °C) Inativada (1 min, 90 °C)

* % de atividade residual após tratamento térmico

Fonte: Adaptado de ŞİMŞEK, 2004.

A massa molar da pectinametilesterase de diversas fontes vem sendo pesquisada, e nota-se que diferem entre si. Para tomates foram encontrados 24-28 kDa (DELINCEE; RADOLA, 1970), 23-35,5 kDa (PRESSEY; AVANTS, 1972) e 15 kDa (INARI et al. 2000), laranja 35,5-37,3 kDa (VERSTEEG; ROMBOUTS; PILNIK, 2000), mamão 53 kDa (LOURENÇO; CATUTANI, 1984) e 32 kDa (FAYYAZ et al. 1994) e batata 27 kDa (SÁENZ et al., 2000), morango 10 kDa (INARI; TAKEUCHI; TOMOEDA, 1996), maçã 28 kDa (MIYAIRI; OKUNO; SAWAI, 1975).

3.3.2 Extração e determinação da atividade da pectinametilesterase de tecidos vegetais

A pectinametilesterase é ionicamente ligada na parede celular e, portanto, um tampão de elevada força iônica é necessário para extraí-la das paredes celulares (CARDELLO; LOURENÇO, 1992). Esta enzima pode ser melhor extraída por alta concentração de sal, ou seja, força iônica elevada ($0,1-1,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$) e tampão alcalino (pH 7,0-9,0) (MCDONNELL; JANSEN; LNEWEAVER, 1945; WICKER; VASSALLO; ECHEVERRIA, 1988; FAYYAZ et al., 1994). A extração depende da concentração salina e do pH do meio extrator, bem como a atividade da enzima depende da presença de cátions mono ou divalentes no meio de reação (CATUTANI, 1982). Cátions competem pelos grupos carboxílicos da pectina e deslocam a enzima do complexo pectina-pectinametilesterase (CORREDIG; KERR; WICKER, 2000).

A enzima pectinametilesterase já foi extraída, purificada e caracterizada de diversas fontes vegetais tais como cenoura (SILA et al., 2007), mamão (FAYYAZ et al., 1994), berinjela (CARDELLO; LOURENÇO, 1992), tomate (LARATTA et al., 1995), caqui (ALONSO; HOWELL; CANET, 1997), figo da Índia e limão Taiti (CONTRERAS-ESQUIVEL et al., 1999), mini tomate vermelho (INARI et al., 2000), batata (SÁENZ et al., 2000), morango (LY-NGUYEN et al., 2002a), banana (LY-NGUYEN et al., 2002b), goiaba (MONDAL et al., 2009), acerola (ASSIS; MARTINS; OLIVEIRA, 2007), pêssego (SAINZ et al., 2004), cenoura preta (ÜNAL; BELLUR, 2009), bagaço de maçã (JOSHI; PARMAR; RANA, 2011), ameixa japonesa (BASANTA et al., 2012), entre outras.

As técnicas mais utilizadas na determinação da atividade da pectinametilesterase são a titulação automática, a medida de pH, a determinação da concentração de metanol por cromatografia gasosa e a espectrofotométrica (REXOVÁ-BENKOVÁ; MARKOVIC, 1976; ROMBOUTS; PILNIK, 1980; HARGEMAN; AUSTIN, 1986). O método mais citado na literatura é a titulação, descrito por Kertesz (1955), e adaptado por diferentes autores ao longo dos anos, seguida da técnica de Hargeman e Austin (1986).

Fujita, Vieites e Campos (2012) realizaram uma avaliação da atividade enzimática no pós-colheita de frutos de maná cubiu (*Solanum Sessiliflorum*) submetidos à radiação gama, e concluíram que o tempo de armazenamento não influenciou na quantidade de pectinametilesterase tratados com doses 0,0 e 0,2 kGy, porém com 0,4 kGy. O período de armazenamento (20 dias) aumentou significativamente a atividade de pectinametilesterase. Nas doses 0,6 e 0,8 kGy o tempo de armazenamento (16 dias) foi suficiente para atingir o maior valor de atividade da pectinametilesterase, 247,66 e 290,74 UE min⁻¹ g⁻¹ de tecido fresco, respectivamente.

Pressey e Avants (1982) concluíram que para hidrolisar a pectina é necessária a ação da pectinametilesterase, em todos os estádios de desenvolvimento do tomate, porém, sua atividade só aumenta durante o amadurecimento. A atividade de pectinametilesterase pode ser afetada pelo pH, temperatura, presença de sais e inibidores diferentes (REXOVA-BENKOVA; MARKOVIC, 1976).

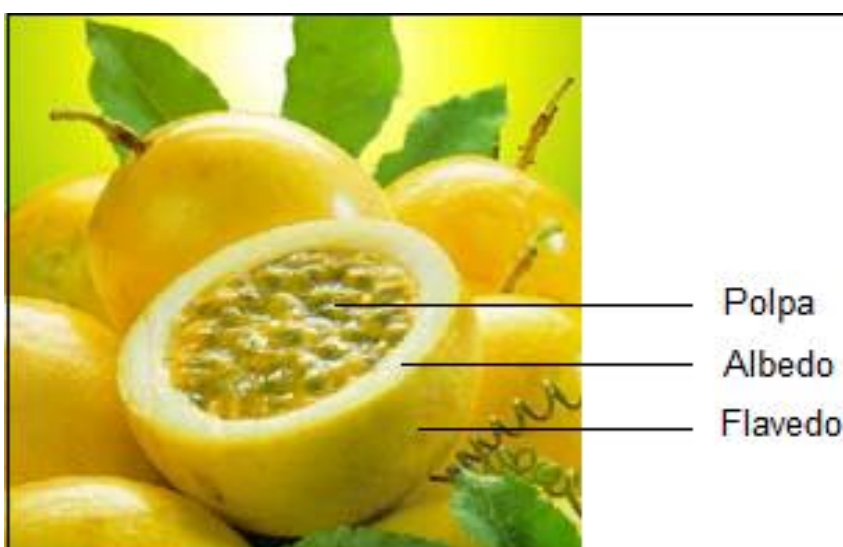
3.4 MARACUJÁ-AMARELO (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)

O maracujá (*Passiflora edulis*) é uma fruta representante do gênero *Passiflora* e da família *Passifloraceae*, que apresenta em torno de quinhentas e oitenta espécies diferentes, sendo que no Brasil ocorrem apenas cinco gêneros, dos catorze existentes (EMBRAPA, 2012). É uma planta trepadeira e lenhosa, com origem na América do Sul, e seus frutos são cultivados, em geral, para produção de sucos (CABRAL; FREIRE JÚNIOR; DA MATTA, 2005). O maracujá é um termo

indígena, que quer dizer “a comida que vem na cuia” (SILVA, 1993), fato este devido ao formato da fruta, quando cortada ao meio, como uma cuia (Figura 9).

Existem três variedades que são produzidas comercialmente, o maracujá amarelo ou azedo (*Passiflora edulis flavicarpa*), o maracujá-roxo (*Passiflora edulis* Sims) e o maracujá doce (*Passiflora alata* Dryand) (EMBRAPA, 2012).

Figura 9 - Frutos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*).



Fonte: Adaptado de EMBRAPA, 2012.

Como nos frutos cítricos, o pericarpo do maracujá é dividido em exocarpo ou flavedo e mesocarpo ou albedo. A película interna ao redor das sementes é o endocarpo ou arilo carnoso. A massa dos frutos varia entre 44 a 160 g distribuídas em uma forma ovalada de, em média, 6 a 8 cm de comprimento por 5 a 7 cm de largura (CABRAL; FREIRE JÚNIOR; DA MATTA, 2005). O maracujá, assim como as demais frutas climatéricas, após a colheita apresenta aumento na taxa respiratória e produção de etileno (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Durante a maturação, passa por diversas alterações de síntese e degradação de componentes, como a degradação de pectina, mudanças de cor da casca e alterações na sua composição química (BRUCKNER; PICANÇO, 2001).

Em relação à composição química, o maracujá-amarelo apresenta alto teor de ácido ascórbico e carotenóides. É um produto de aroma acentuado com característica ácida, onde o pH pode variar de 2,6 a 3,4, sendo os ácidos cítrico e

málico os principais responsáveis pela acidez total, os açúcares totais e açúcares redutores variam de 8,3 a 11,6 %, e de 5,0 a 9,2 %, respectivamente (CABRAL; FREIRE JÚNIOR; DA MATTA, 2005; EMBRAPA, 2012).

A alta umidade da casca do maracujá indica a necessidade de secagem para a conservação, já que altas taxas de umidade favorecem desenvolvimento microbiano. Porém esta técnica de conservação pode interferir nas atividades subsequentes, como preparo de doce (PARK et al., 2006) e até, dependendo da temperatura, inativar enzimas que se deseja estudar, como as pectinesterases, por exemplo, entre outras.

Aguirre et al. (2006) em estudo sobre a maturação do maracujá-amarelo, percebeu que a quantidade de sólidos solúveis (°Brix) no suco variou de $14,6 \pm 1,96$ (8ª semana) a $16,8 \pm 0,08$ (12ª semana), dependendo da semana após a antese¹. A alteração da cor da casca do maracujá, também ajuda na identificação do grau de maturação. Estas alterações estão relacionadas com as reações bioquímicas que ocorrem nos frutos (GAMARRA ROJAS; MEDINA, 1996; SALOMÃO; VIEIRA; MOTA, 2001).

Por apresentar cerca de trezentos compostos voláteis identificados e alcalóides, o maracujá-amarelo tem um efeito sedativo leve (MACHADO et al., 2003). Substâncias como a passiflorina, ésteres e compostos sulfúricos foram detectadas nos frutos do gênero *Passiflora* e são importantes para a formação do aroma dos frutos (SEIDERMAN, 2002).

A matéria-prima *in natura* está propensa ao ataque de fungos produtores de enzimas pectinolíticas, um exemplo é que em diversos estudos já encontraram quantidade razoável de pectinametilesterase nativa nas cascas de frutos cítricos. Ao contrário da enzima fúngica, a pectinametilesterase nativa cria blocos de material desesterificado, que não é desejável em algumas aplicações industriais (MAY, 1990; THAKUR; SINGH; HANDA 1997).

Aguirre et al., (2006) avaliaram as mudanças na atividade de pectinametilesterase e poligalacturonase durante o amadurecimento do maracujá-amarelo, uma vez que estas enzimas estão associadas à degradação das substâncias pécticas presentes nos arilos e na casca dos frutos maduros, estas

¹s.f. Botânica. O desabrochar da flor, que dá saída ao pólen (DICIONÁRIO AURÉLIO BETA, 2013).

agem de forma sincronizada, e concluíram que após a 8ª semana após a antese, os frutos apresentavam propriedades aceitas pelas normas de qualidade internacional. A pectinametilesterase atingiu o máximo de atividade nesta mesma semana e a poligalacturonase na 9ª semana.

Reolon, Braga e Salibe (2009) avaliaram as características físico-químicas do maracujá-amarelo em três estágios de maturação, sendo o primeiro a cor da casca 100 % verde, o segundo 50 % verde e 50 % amarelo, e o terceiro estágio com o fruto 100 % amarelo, e em relação à quantidade de pectina total presente encontraram os seguintes valores, 28,51, 24,85 e 20,69 g/100 g de matéria seca, respectivamente. Nota-se que há diminuição do teor de pectina, indicando que estas estão sendo degradadas pelas enzimas responsáveis pelo amadurecimento do fruto, ou seja, amolecendo os tecidos vegetais. Se considerar o aproveitamento da casca e albedo do fruto como matéria-prima é necessário realizar a colheita quando a casca se apresentar verde ou levemente amarela.

A mudança na coloração da casca é um dos critérios que indicam o ponto de colheita, e indica, ainda, alterações físico-químicas que ocorrem durante o amadurecimento (BRUCKNER; PICANÇO, 2001). Para Tavares et al., (2003) o maracujá atinge seu ponto de colheita 20-30 dias antes de se desprender da planta, ou seja, 50-60 dias depois da antese, quando atinge o peso máximo e os maiores teores de sólidos solúveis entre 13-18 °Brix.

Coelho, Cenci e Resende (2010) avaliaram a qualidade do suco de maracujá-amarelo em pontos de colheita diferentes e após o amadurecimento, e constataram que o ponto ótimo de colheita da safra de inverno foi quando identificaram os frutos com 30,7 % de área de superfície da casca amarela, e pelas análises físico-químicas realizadas o suco apresentou parâmetros de qualidade adequados ao consumo *in natura*.

A produção de maracujá no Brasil cresce a cada ano, sendo que o Pará é o estado que produz um terço da produção nacional (BIBVIRT, 2005), além de produtor e consumidor, é um exportador, tanto da fruta quanto de suco (SANTI, 2005), junto com Colômbia, Peru e Equador, que se destacam na produção e exportação da fruta. Os países importadores são Alemanha, Holanda, Reino Unido, França e Bélgica. Os países africanos são produtores de maracujá-roxo e os sul-americanos são produtores de maracujá-amarelo. São exemplos de produtos a base

de maracujá: suco simples, concentrado e em pó, néctares, licores, fermentado e geleias (EMBRAPA, 2012).

Diferentes grupos de pesquisa têm se dedicado ao estudo do reaproveitamento dos resíduos desta fruta. Sua semente possui ácido linoléico e a casca e albedo apresentam elevado teor de pectina (CABRAL; FREIRE JÚNIOR; DA MATTA, 2005). O uso principal do albedo do maracujá tem sido na produção de farinha, que é adicionada a diversos alimentos. São exemplos de reaproveitamento do albedo a produção de doce em massa (DIAS et al., 2011), doce em calda (FIGUEIREDO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2002), biscoito (ISHIMOTO et al., 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Os frutos de maracujá-amarelo foram obtidos no comércio do município de Ponta Grossa, Paraná, Brasil, sendo selecionados em função das seguintes características: frutos firmes, isentos de defeitos e injúrias com grau de maturação uniforme. Foram selecionados 20 frutos (10 verdes e 10 amarelos, com massas totais de 3,344 kg e 3,307 kg, respectivamente), de acordo com a cor da casca (flavedo) com coloração predominantemente verde ou amarela (Figura 10).

Figura 10 - Coloração do flavedo das amostras de maracujás utilizadas (A - predominantemente amarelo e B - predominantemente verde).



Reagentes utilizados: pectina com grau esterificação (DE) de 70 % (cedida gentilmente pela CP Kelco-HM), hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl), sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cloreto de sódio (NaCl), ácido etilenodiaminotetracético (E.D.T.A.), tampão fosfato de sódio, tampão fosfato de potássio, tampão TRIS-HCl, metabissulfito de sódio $(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5)$, bissulfito de sódio (NaHSO_3) , 2-mercaptoetanol $(\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH})$, polivinilpirrolidona $[\text{PVPP}-\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}]_n$.

Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água ultra-pura obtida em Ultra Purificador de Água GEHAKA (Labstore/Master System).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Pré-processamento das amostras

Nesta etapa os frutos foram lavados em água corrente, descascados, cortados e separados em polpa, flavedo e albedo. A matéria-prima para as análises foi a fração constituída pelo albedo.

Metade desse material pré-processado, aproximadamente 1,5 kg de cada maracujá (verde/maduro) foi instantaneamente congelada a -78 °C em ultra-freezer² e submetida ao processo de liofilização em equipamento LD1500 Terroni® nas seguintes condições: vácuo inicial de 1335 µHg e final de 0,037 µHg, temperatura de -58 °C (início 25/07/2013-12 h, término 31/07/2013-8h15 min). O material liofilizado foi armazenado em vidros hermeticamente fechados.

A outra metade utilizada nos estudos foi denominada como material fresco. O armazenamento desta alíquota de amostra foi realizado sob-refrigeração (+7 °C) e congelamento (-6 °C).

Para a correção do pH utilizou-se NaOH 0,01 N e HCl 0,01 N livres de CO₂, para isto, estas soluções foram submetidas ao banho de ultrassom (Ultra Sonic Cleaner 1400-Unique) por 30 min antes da utilização.

Após cada etapa dos ensaios, foi analisada a atividade da enzima pectinametilesterase. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico

4.2.2 Determinação do Teor de Sólidos Solúveis Totais (°Brix)

A fim de relacionar o grau de maturação com a coloração do flavedo (casca) utilizou-se o teor de sólidos solúveis totais (°Brix). A concentração de sólidos

² As amostras são preparadas em bateladas juntamente com amostras de outros pesquisadores e por esse motivo não se pode precisar o tempo exato da liofilização.

solúveis totais (°Brix) na polpa das amostras foi determinada com o uso de refratômetro de bancada ABBE de Projeção modelo WY1A®.

4.2.3 Protocolo de Extração da Enzima Pectinametilesterase

Foram testados cinco métodos diferentes, com algum tipo de modificação em função das condições de trabalho em cada laboratório, baseadas em trabalhos com fontes vegetais diversas, como a berinjela (CARDELLO; LOURENÇO, 1992), cascas de laranja (ŞİMŞEK, 2004), banana (LY-NYGUEN et al., 2002b), maçã (DENE'S; BARON; DRILLEAU, 2000) e mamão (PINTO, 2009).

Para cada uma das extrações realizadas foi utilizada a matéria-prima no estágio de maturação verde ou maduro, sendo utilizados 30 g de material fresco e 3 g de material liofilizado, considerando a umidade média do albedo fresco ao redor de 90 % (CANTERI, 2010). Todas as amostras foram homogeneizadas em mixer caseiro Black&Decker®, e dependendo da técnica utilizada, a proporção de solução para amostra, durante a homogeneização variou.

Todas as soluções foram preparadas com água ultra-pura gelada para manter as soluções frias durante a homogeneização. As filtrações foram realizadas em filtro de tecido sintético (*cheesecloth*) em todas as etapas, e as centrifugações foram realizadas em Centrífuga Hitachi High-Speed Refrigerated centrifuge Himac CR21GII®.

Após as extrações e determinação das atividades, os resultados obtidos foram convertidos para total de atividade enzimática em 1,0 g de amostra, para equiparação dos resultados devido às diferentes diluições, e as massas de matéria prima utilizadas na extração como segue: 3,0 g e 30 g de amostras, liofilizada e fresca, respectivamente.

No método 1 (CARDELLO; LOURENÇO, 1992), as amostras de maracujá foram homogeneizadas por 1 minuto na proporção 1:5 (m/v), em solução tampão fosfato de sódio (5 mmol L⁻¹, pH 7,5), contendo E.D.T.A. (20 mmol L⁻¹), metabissulfito de sódio (10 mmol L⁻¹), cloreto de sódio (0,6 mol L⁻¹) e 2-mercaptoetanol (5 mmol L⁻¹). A suspensão foi mantida sob agitação lenta por 1 hora em banho de gelo, seguido de filtração. O filtrado foi aquecido a +50 °C por 1 hora, sendo em seguida resfriado em banho de gelo e centrifugado a 15.000 rpm por 60

minutos a +4 °C. O sobrenadante coletado foi denominado de extrato enzimático bruto 1.

No método 2 (ŞİMŞEK, 2004), homogeneizou-se cada amostra de maracujá apenas com água ultra-pura gelada. O material foi filtrado e ressuspendido em água ultra-pura gelada mais duas vezes. O filtrado foi pesado (aproximadamente 30 g para ambas as amostras fresca e liofilizada) com adição de solução de NaCl 1,0 mol L⁻¹. Este material foi agitado por 30 minutos, em agitador magnético, para a extração da enzima, novamente filtrado e o sobrenadante centrifugado a 15.000 rpm por 30 minutos a +4,0 °C. O *pellet* foi descartado, o sobrenadante coletado e chamado de extrato enzimático bruto 2.

No método 3, adaptada dos trabalhos de Ly-Nguyen et al. (2002b) com bananas, as amostras foram lavadas com água ultra-pura gelada, seguidas de centrifugação a 15000 rpm por 30 minutos a +4,0 °C, e descartado o sobrenadante. O *pellet* foi ressuspendido em água ultra-pura gelada e novamente centrifugada na mesma condição anterior. Para a solubilização da pectinametilesterase utilizou-se um tampão alcalino (Tris-HCl 0,2 mol L⁻¹ com NaCl 1,0 mol L⁻¹, em pH 8) na proporção de 1:1, o material foi misturado em tampão (1:1), durante a noite (*overnight*). Após a extração a suspensão foi centrifugada a 15.000 rpm por 60 minutos a +4,0 °C o *pellet* descartado, e o sobrenadante foi chamado extrato enzimático bruto 3.

O método 4 foi baseada no trabalho de Dene's, Baron e Drilleau (2000) com maçãs. A amostra foi homogeneizada com água ultra-pura gelada contendo 500 mg L⁻¹ de sulfito de sódio. O material foi centrifugado a 15.000 rpm por 30 minutos a +4,0 °C e o *pellet* foi ressuspendido em água ultra-pura gelada contendo 500 mg L⁻¹ de sulfito de sódio e centrifugada novamente. O *pellet* foi ressuspendido em tampão Tris-HCl 20 mmol L⁻¹ (pH 7,5) e NaCl 1,0 mol L⁻¹ contendo 500 mg L⁻¹ de sulfito de sódio, seguido por centrifugação a 15.000 rpm por 30 minutos a +4,0 °C. O sobrenadante foi homogeneizado com 1,0 % (m/v) de PVPP insolúvel por 30 minutos e centrifugado nas condições anteriores. O tratamento com PVPP foi repetido três vezes e o último sobrenadante foi denominado de extrato enzimático bruto 4.

O método 5 foi baseada nos ensaios de Pinto (2009), que trabalhou com mamão. Nesta extração as amostras foram homogeneizadas com solução de NaCl 1,0 mol L⁻¹, pH 7,5 contendo 1,0 % (m/v) de polivinilpirrolidona (PVPP) insolúvel.

Esta solução foi centrifugada a 15.000 rpm durante 30 minutos a +4,0 °C, e o sobrenadante (extrato enzimático bruto 5) foi utilizado para a dosagem da atividade da enzima.

4.2.4 Determinação da atividade da pectinametilesterase

Para cada extração testada foi determinada a atividade enzimática pelo método espectrofotométrico (HARGEMANN; AUSTIN, 1986). Baseada na mudança de cor do indicador azul de bromotimol (pK_a 6,0), que está associada ao diminuição do pH, devido à hidrólise da ligação éster da pectina pela pectinametilesterase, com exposição dos grupos carboxílicos. O pH de todas as soluções (substrato, extrato enzimático e indicador) foi ajustado para 7,5 com de NaOH 0,01N, livre de CO_2 .

O substrato para estimar a atividade enzimática constituiu-se de uma solução de pectina cítrica 10 g L^{-1} (1,0 %), diluída em solução de NaCl $1,0\text{ mol L}^{-1}$ preparada em água ultra-pura com aquecimento e sob agitação constante. As medidas de pH foram realizadas em pHmetro PHS-3B-Labmeter, model pH 2®.

Foram colocados 2,0 mL de solução de pectina em cubeta com caminho ótico de 1,0 cm, junto com 150 μL de azul de bromotimol. Em seguida, 800 μL de cada extrato enzimático bruto foram adicionados (HARGEMANN; AUSTIN, 1986), e o decréscimo da absorbância a 620 nm foi monitorado por 2 minutos, com leituras a intervalos de 5 segundos em espectrofotômetro Spectrum/Vis Spectrophotometer SP-1105®. A atividade da pectinametilesterase de 1 U foi definida como um decréscimo de 0,1 unidade na absorbância por minuto (JAKÓB; BRYJAK; POLAKOVIČ, 2009) por mL de amostra utilizada no ensaio (U/min/mL). As leituras das absorbâncias foram realizadas a 20 °C.

Para verificar as melhores concentrações e o tipo de solvente para diluição do indicador na atividade de pectinametilesterase utilizou-se as concentrações de 0,01 % ($1,6 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$), 0,02 % ($3,2 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$), 0,04 % ($6,4 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$) e 0,06 % ($9,6 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$) de azul de bromotimol. O indicador foi preparado em duas soluções alcoólicas (70 % e 30 %), em tampão fosfato de potássio $3,0\text{ mmol L}^{-1}$ e em água.

4.2.5 Efeito das concentrações de NaCl na extração e na atividade da pectinametilesterase

A matéria prima utilizada nos ensaios dos itens 4.2.4 a 4.2.10 foi o extrato bruto da amostra verde liofilizada.

Foi testado o efeito de NaCl em diferentes concentrações (0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,0; 1,1; 1,3 e 1,5 mol L⁻¹ e sem NaCl) na extração da enzima presente no albedo de maracujá-amarelo.

Também foi verificado o efeito deste sal adicionado ao substrato durante a leitura da atividade da enzima. Para isto preparou-se quatro soluções de pectina 10 g L⁻¹ contendo diferentes concentrações de NaCl (0,2; 0,5; 1,0 e 1,5 mol L⁻¹), e também uma solução controle (sem NaCl).

4.2.6 Efeitos da concentração de substrato na atividade da pectinametilesterase em extrato bruto

A influência da concentração de substrato na atividade da pectinametilesterase no extrato bruto foi analisada, sendo a atividade enzimática medida nas concentrações de 0,2; 0,5; 0,8; 1,0; 1,2 % de uma solução de pectina cítrica diluída em solução de NaCl 1,0 mol L⁻¹, preparada em água ultra-pura com aquecimento e sob agitação constante e outra solução como controle, contendo apenas NaCl 1,0 mol L⁻¹.

4.2.7 Avaliação da atividade da pectinametilesterase em extrato bruto após período de armazenamento

A atividade também foi avaliada após período de armazenamento da matéria-prima. Os frutos de maracujás verdes foram submetidos à conservação por congelamento (-6,0 °C) e refrigeração (+7,0 °C) por 7, 14, 21 e 28 dias e por liofilização (armazenada por 0, 15, 30 e 45 dias, sendo zero o dia em que a amostra saiu do equipamento). A cada período de tempo estabelecido, a

pectinametilesterase foi extraída e a atividade determinada e comparada com uma amostra controle (amostra fresca).

Outra análise referente ao armazenamento do extrato enzimático bruto obtido de uma amostra de maracujá verde liofilizada foi realizada. Esse extrato foi mantido sob-refrigeração (+7,0 °C) e teve sua atividade enzimática determinada a cada dia, por um período de cinco dias.

4.2.8 Estudo do pH e da temperatura ótimos sobre a atividade enzimática da pectinametilesterase em extrato bruto

Foi determinado o efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática. Para a análise do pH ótimo, o extrato enzimático (obtido pela junção das técnicas 5 e 2 de amostra de maracujá verde liofilizado) e a solução coloidal de pectina 10 g L⁻¹, bem como o indicador azul de bromotimol (0,04 %), tiveram o pH ajustado para os valores 4, 5, 6, 7, 7,5, 8, 9 com NaOH 0,01 N, livre de CO₂, em seguida a atividade foi determinada na temperatura de ± 20 °C.

Nos ensaios para determinação da temperatura ótima da pectinametilesterase, foi selecionado o pH 7,5, seguindo as mesmas condições citadas no parágrafo anterior. Entretanto, houve o ajuste da temperatura para 20, 30, 40, 50, 60, 80 °C, e ao atingir a temperatura desejada a atividade foi determinada logo em seguida.

4.2.9 Estabilidade térmica da pectinametilesterase presente em extrato bruto

A estabilidade térmica foi determinada nas temperaturas de 40, 50, 60 e 80 °C para o extrato bruto obtido do material verde liofilizado. As amostras foram mantidas nas temperaturas desejadas por 10 min, resfriadas em temperatura ambiente, por 60 min. A atividade residual foi determinada e comparada ao controle. O controle constituiu-se de análise da atividade enzimática realizada sem aquecimento do extrato enzimático bruto.

4.2.10 Precipitação da pectinametilesterase do extrato bruto com sulfato de amônio

Para determinar a melhor faixa de precipitação da pectinametilesterase de maracujá-amarelo com sulfato de amônio foi realizado ensaio de acordo com tabela (Anexo 01) de faixas de concentração do sal de 0-20, 20-40, 40-60, 60-80 e 80-90 % (CARVALHO et al., 2012).

Ao extrato bruto foi adicionado o sulfato de amônio sólido e deixado em repouso por uma noite (*overnight*) em refrigerador a +7,0 °C. Após, realizou-se centrifugação a 15.000 rpm por 45 minutos a +4,0 °C, e o precipitado foi recolhido e diluído em tampão Tris-HCl 0,2 mol L⁻¹, pH 8, e a atividade determinada. O sobrenadante de cada centrifugação foi utilizado para precipitação seguinte, na faixa de concentração subsequente. Após cada etapa de precipitação foi verificada a presença de atividade enzimática.

Também foi determinada a proteína total, de cada fração obtida, pelo método de Bradford (Anexo 2) a fim de estimar a atividade específica da pectinametilesterase.

4.2.11 Análise Estatística

A análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias dos tratamentos foram avaliadas pelo Teste de Tukey, com 5 % de significância com o auxílio do software SASM-AGRI (CANTERI et al., 2001).

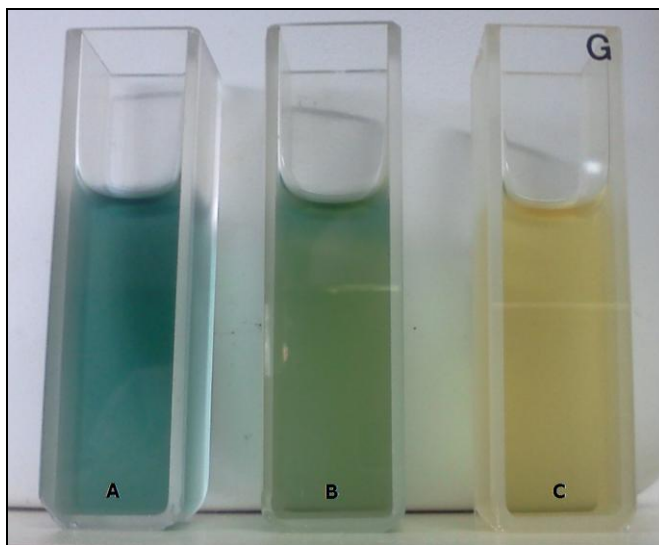
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PECTINAMETILESTERASE

Com o objetivo de testar diferentes métodos diferentes para a determinação da atividade da pectinametilesterase, foram escolhidos o titulométrico (KERTESZ, 1955), o espectrofotométrico (HARGEMANN; AUSTIN, 1986) e a variação do pH (GONZALEZ, 2009). A partir dos resultados e das dificuldades encontradas no decorrer dos ensaios, foi selecionado para esta dissertação o método espectrofotométrico.

Nesta metodologia de determinação de atividade enzimática, ocorre a reação entre enzima e substrato liberando íons H^+ que acidificam o meio, e devido a presença de um indicador (azul de bromotimol), há mudança na coloração da solução (Figura 11), percebida na diminuição da absorbância (620 nm) em espectrofotômetro (HARGEMANN; AUSTIN, 1986), que indica, de forma indireta a atividade enzimática.

Figura 11 - Mudança da coloração na reação enzimática entre extrato contendo pectinametilesterase e pectina 10 g L^{-1} NaCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (20°C , pH 7,5, e indicador 0,04 %).



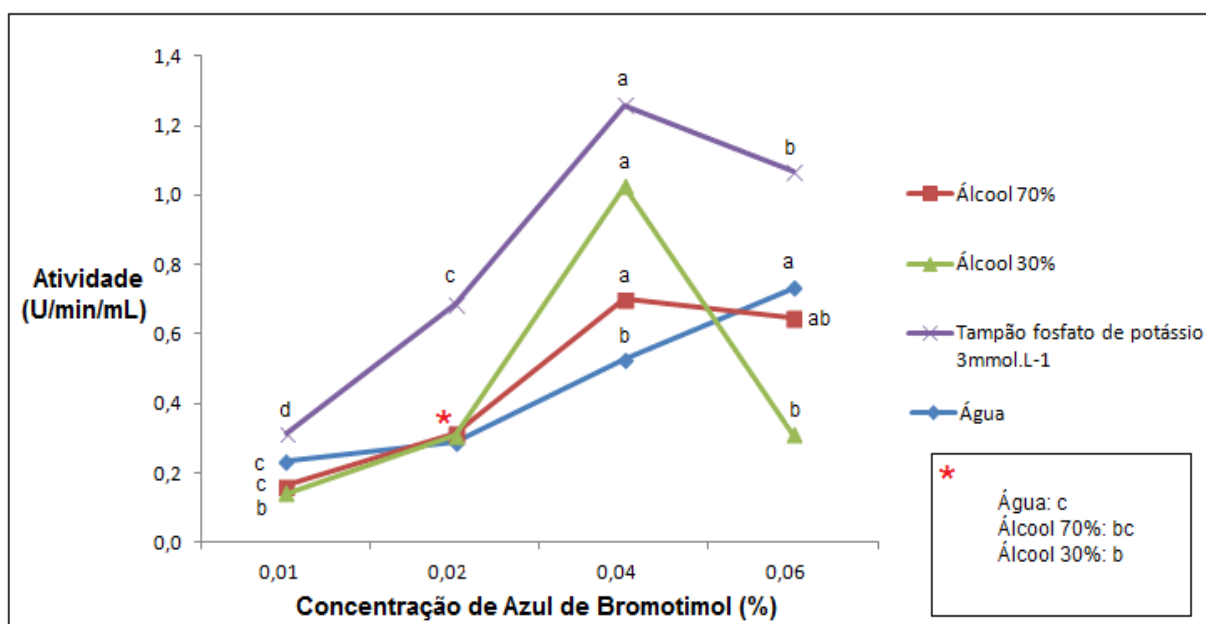
A: pectina + bromotimol; B: 70% do tempo de reação; C: reação concluída.

De acordo com Assis (2000), este método pode ser considerado vantajoso, uma vez que é rápido, específico e sensível.

Os trabalhos pesquisados citam concentrações diferentes de indicador como 0,01%, 0,1%, e 1,0% (JAKÓB; BRYJAK; POLAKOVIČ, 2009; HARGEMANN; AUSTIN, 1986; FONTES et al., 2008).

Com o intuito de verificar as melhores concentrações e o tipo de solvente para diluição do indicador na atividade de pectinametilesterase, estes parâmetros foram testados (Figura 12).

Figura 12 - Efeito da concentração de azul de bromotimol na atividade de pectinametilesterase em extrato bruto de albedo de maracujá a 620 nm (pH 7,5, pectina 10 g L⁻¹, NaCl 1,0 mol L⁻¹, 20 °C).



Letras minúsculas iguais no mesmo solvente indicam similaridade estatística por meio da ANOVA e Teste de Tukey a 5 % de significância.

Percebe-se que o comportamento da atividade é semelhante nas mesmas concentrações de indicador para três das soluções, ou seja, aumenta até 0,04 %, e decresce a partir de 0,06 %, exceto para a água como solvente, com aumento crescente até 0,06 %. Na análise estatística (5 % de significância) verificou-se que para o indicador preparado em tampão houve diferença estatística entre os 4 tratamentos, para a água, a similaridade estatística foi apenas entre os tratamentos 1 e 2, na amostra em álcool 30 % o tratamento 3 apresentou diferença estatística

dos demais, e para o álcool 70 % os tratamentos 3 e 1 foram diferentes e houve interseção de similaridad entre os tratamento 4 e 2.

De acordo com a Lei de Lambert-Beer, em soluções com concentração superior a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, as moléculas apresentam-se mais próximas umas das outras e isto pode causar uma leve mudança na absorvidade (SKOOG et al., 2006).

Verificou-se ainda que a atividade obtida na solução tampão fosfato de potássio 3 mmol L^{-1} foi superior às demais, confirmando o resultado esperado, uma vez que a metodologia inicial de Hargemann e Austin (1986) utilização este tipo de solução na preparação do indicador. O aumento de atividade observado na concentração de 0,04 % para a solução tampão fosfato de potássio 3 mmol L^{-1} foi de 44,4 % em relação à solução de álcool 70 %, de 18,6 % à álcool 30 % e de 41,23 % à água. Percebe-se que a atividade enzimática sofre uma leve interferência da concentração de álcool, devido a uma desnaturação parcial da enzima. Notou-se que durante o preparo das soluções de indicador, o maior tempo para dissolução foi gasto na solução preparada em água.

Pode ainda ocorrer desvios na leitura das absorbâncias pela utilização de solução de indicador preparada em solução não tamponada (SKOOG et al., 2006).

Os ensaios de atividade enzimática devem ocorrer no mesmo pH para evitar mudanças na coloração. Entretanto, tampões acabam por interferir com a medida da produção de ácido. Assim, os reagentes devem ser preparados sem tampão ou com tampão fraco. Resultados sugerem que o pH inicial para ensaio de atividade da pectinametilesterase deve estar entre 7,2 e 7,8 e é padrão utilizar 7,5 (HARGEMANN; AUSTIN, 1986).

Sendo o ponto de viragem do azul de bromotimol entre 6 e 7,6, e a absorbância máxima a 620 nm, este indicador é utilizado na determinação da atividade de pectinametilesterase nas condições de pH nessa faixa de viragem (GONZALEZ, 2009).

Porém, para efeitos de padronização, utilizou-se o pH 7,5 em todas as reações de determinação de atividade. Com base nos resultados obtidos foi possível estabelecer a concentração ideal (0,04 %) de indicador bem como o melhor solvente (tampão fosfato de potássio $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$).

Sabe-se que em pH's mais alcalinos, por volta de 8, pode ocorrer saponificação alcalina da pectina, e atividades medidas nesse pH não são confiáveis devido à essa reação (REXOVA-BENKOVA; MARKOVIC, 1976).

5.2 PROTOCOLO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO COM ENZIMA PECTINAMETILESTERASE

Como ocorre em muitas frutas, é comum um aumento do teor de sólidos solúveis totais no início do amadurecimento, tendendo a diminuir ou até estabilizar (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Na Tabela 2, encontram-se os valores médios dos sólidos solúveis totais (SST) das polpas de maracujá em estágio de maturação verde e maduro.

Tabela 2 - Sólidos solúveis totais (°Brix) obtidos da polpa das amostras de maracujás em dois diferentes graus de maturação.

Coloração da casca	°Brix (média $\pm$ desvio-padrão)
Amarela	12,78 ($\pm$ 1,48)
Verde	8,11 ($\pm$ 2,60)

Aguirre et al. (2006), ao estudarem as mudanças na atividade da α -amilase, poligalacturonase e pectinametilesterase no suco do maracujá-amarelo durante a maturação, encontraram os seguintes valores de °Brix, relativos às semanas após a antese das plantas: 14,6 $\pm$ 1,96; 16,5 $\pm$ 0,56; 16,7 $\pm$ 0,54; 18,41 $\pm$ 1,0 e 16,8 $\pm$ 0,08 para a semana 8, 9, 10, 11 e 12, respectivamente. Concluíram que a maior atividade da pectinametilesterase no suco de maracujá-amarelo foi na 8ª semana após a antese, com °Brix igual a 14,6.

Nos trabalhos de Veras, Pinto e Meneses (2000), não houve diferença significativa nos teores de SST no suco do maracujá-amarelo. As amostras constituíram-se de amostra de maracujá com coloração do flavedo mais verde que amarelo, e uma amostra mais amarela do que verde, e os valores para o °Brix foram respectivamente de 14,67 e 15,21 °Brix. Concluíram ainda que, após a colheita ocorre mudança intensa na coloração.

De acordo com os trabalhos de De Marchi et al. (2000), o °Brix para o maracujá com flavedo todo amarelo, dependendo da época de colheita, variou de 13,94 a 14,53, e nos frutos com coloração 1/3 amarela, os resultados de SST foi significativamente inferiores. Segundo esse autor, não há aumento expressivo dos

sólidos solúveis do maracujá-amarelo em função da coloração da casca, como ocorre em outras frutas climatéricas.

Machado et al. (2003) encontraram valores de SST do albedo do maracujá e da polpa, respectivamente, de 4,6 e 13,08. O albedo apresenta alto teor de sólidos solúveis totais devido aos ácidos orgânicos, e são constituídos de açúcares totais (1,35 %) e o teor de pectina (2,10 %).

Para duas variedades de maracujás doces (*P. alata* e *P. nítida*) Cohen et al. (2008) determinaram o teor de sólidos solúveis totais de 20 e 18, respectivamente, para frutos 100 % amarelos.

Silva et al. (2005) avaliaram a influência dos estádios de maturação na qualidade do suco de maracujá-amarelo e concluíram que o teor de SST do suco aumentou até o fruto atingir 65 % da coloração da casca amarela, e a partir de então permaneceu constante. A mudança de coloração desses frutos, de verde para vermelho, começa em média 64 dias após a antese, e com aproximadamente 100 dias os maracujás já se encontram totalmente amarelos. Silva et al. (2010) estudando a maturidade fisiológica do maracujazeiro-amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* Degener) observaram uma variação no teor de sólidos solúveis totais ao longo do período experimental em função do desenvolvimento, com aumento de 8,6 °Brix, aos 45 dias após a antese (daa), para 12,9 °Brix, aos 72 daa.

Baseado nas considerações destes autores e nos resultados obtidos nestes trabalhos pode-se indicar que os frutos utilizados no presente trabalho encontravam-se com menos de 64 (aproximadamente 45 dias) e 100 (aproximadamente 72 dias) dias após a antese, respectivamente, amostra verde e amarela.

Na Tabela 3 encontram-se os resultados da determinação da atividade da enzima pectinametilesterase em extrato bruto, obtida do albedo do maracujá-amarelo nos estádios de maturação verde e maduro frescos e a comparação com amostras liofilizadas. Para o cálculo da atividade final de cada amostra e correção da diluição, os valores foram convertidos para padronização dos dados em 1,0 g de amostra, devido aos volumes e massas diferentes utilizados na extração da enzima.

De acordo com Tavares et al. (2011), é possível identificar a presença da pectinametilesterase em material liofilizado, uma vez que estes autores trabalharam com mucilagem de inhame liofilizada, na qual detectaram a presença desta enzima. Entretanto, sabe-se que as enzimas podem desnaturar durante a liofilização,

ocorrendo diminuição ou perda de atividade durante o congelamento e o armazenamento das amostras (SILVA, 2002).

Tabela 3 - Comparação da atividade de pectinametilesterase em extrato bruto (U/min/mL) obtida do albedo do maracujá-amarelo por diferentes métodos, grau de maturação (verde/maduro) e situação da amostra (fresca/lioofilizada).

	Maracujá-amarelo fresco	Maracujá-amarelo lioofilizado	Maracujá-verde fresco	Maracujá-verde lioofilizado
Método 1	1,12±0,3 ^{cB}	4,18±0,4 ^{bB}	4,69±2,5 ^{bB}	33,20±4,3 ^{bCA}
Método 2	4,22±0,9 ^{bC}	38,09±11,8 ^{abB}	10,98±0,7 ^{aC}	68,45±0,9 ^{aA}
Método 3	2,22±0,6 ^{cB}	51,03±26,2 ^{aA}	2,67±0,2 ^{bB}	17,71±5,9 ^{cB}
Método 4	3,78±0,2 ^{bB}	28,39±7,0 ^{abAB}	3,06±0,5 ^{bB}	67,36±26,6 ^{abA}
Método 5	6,19±0,2 ^{aC}	57,08±1,1 ^{aB}	3,17±1,1 ^{bC}	83,33±7,5 ^{aA}

Letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam similaridade estatística por meio da ANOVA e Teste de Tukey a 5 % de significância.

No método 1 foram utilizados como reagentes de extração o E.D.T.A. como quelante de íons, principalmente o Ca^{+2} , o metabissulfito de sódio e o 2-mercaptoetanol com ação antioxidante, para inibir a ação dos compostos fenólicos presentes. A utilização isolada de cada um destes reagentes não é satisfatória de acordo com Cardello e Lourenço (1992), que determinou ainda que um aquecimento de 50 °C por uma hora é suficiente para a retirada da pectina que ocasiona a formação de gel estável no extrato enzimático bruto.

No método 2 o material foi submetido a lavagem em água ultra-pura gelada por três vezes para a retirada das substâncias solúveis, o que, de acordo com Şimşek (2004) a utilização da tripla lavagem antes da extração evita a formação de gel devido à presença de pectina. Lavagem semelhante foi realizada na técnica 3, na qual cada amostra foi homogeneizada em água ultra-pura gelada, para retirada de uma fração de pectina. Porém, como a enzima permanece associada a parede celular, foi necessário a utilização de um tampão alcalino adicionado de NaCl 1,0 mol L⁻¹ (1:1), que solubiliza tanto a pectinametilesterase como quantidades variáveis de pectina adicionais.

No método 4, a extração foi realizada de forma a evitar a perda de atividade pela inibição dos fenólicos e solubilizar a pectinametilesterase da parede celular. A amostra foi homogeneizada em água ultra-pura gelada contendo 500 mg L⁻¹ de

sulfito de sódio, seguido por centrifugação a 15.000 g por 30 minutos a +4,0 °C sendo o *pellet* ressuspendido em de água ultra-pura gelada também com 500 mg L⁻¹ de sulfito de sódio e centrifugada novamente. Este procedimento permite eliminar substâncias solúveis como proteínas, fenólicos, açúcares e pectinas (DENE'S; BARON; DRILLEAU, 2000). Como a pectinametilesterase é uma enzima ligada a parede celular nos vegetais por meio de ligações iônicas, é necessário para a sua extração a utilização de soluções de alta força iônica ou o aumento de pH do meio (BENEN; VAN ALEBEEK; VORAGEN, 2003).

Além do sulfito e do metabissulfito de sódio foi testado como agente antioxidante, nos métodos 4 e 5 o PVPP, sendo que no método 4 foi utilizado por três vezes consecutivas (homogeneização e centrifugação), enquanto que no método 5 foi utilizado apenas uma vez. A utilização do PVPP como antioxidante é frequente em extratos vegetais, porém a adição deste composto não interferiu na atividade da pectinametilesterase, de acordo com os trabalhos de Şimşek (2004) e Awad e Young (1980), sendo que estes últimos autores concluíram que a pectinametilesterase não é afetada por fenóis liberados após a ruptura das células. Para Şimşek (2004), a lavagem do material com acetona, antes da extração da pectinametilesterase, é mais eficiente para remoção dos compostos fenólicos, mas em seus estudos a técnica com o uso de acetona não foi a que apresentou aumento na atividade da enzima, e ainda que a ação dos fenóis não causa diminuição ou perda da atividade da pectinametilesterase durante sua extração.

De acordo com os resultados obtidos, percebe-se que as extrações realizadas pelos métodos 1 e 3 não foram satisfatórias, devido ao aquecimento na primeira e possível interferência do pH do tampão na extração na terceira. Sainz et al. (2004) determinaram o melhor pH de extração da pectinametilesterase de pêssegos, e concluiu que a maior atividade é obtida em amostras de enzima extraídas em pH 7.

Também foi possível perceber que amostra verde liofilizada apresentou maior atividade da pectinametilesterase em quase todos os métodos, de acordo com a Tabela 3. Fato semelhante foi encontrado por Awad e Young (1980), que trabalhando com frutos do abacateiro perceberam que a liofilização aumentou em 29 % e 46 % a atividade da pectinametilesterase para os cultivares Fuerte e Hass, respectivamente. Este fato também pode ser percebido com as amostras liofilizadas de albedo de maracujá, com aumento na atividade enzimática. Isto significa que o

melhor material para extração da pectinametilesterase é o material liofilizado, indicando que o processo de liofilização não afeta a pectinametilesterase do maracujá.

Sabe-se que em matérias-primas sem tratamento térmico há degradação enzimática da pectina, uma vez que foi possível verificar a presença de atividade enzimática em amostras de albedo de maracujá liofilizado (CANTERI, 2010).

De acordo com Tucker (1993), a atividade da enzima pectinametilesterase pode sofrer oscilações ao longo do período de maturação. Isto depende de fatores diversos, como tipo do fruto e o método de extração utilizado. Estas variações na atividade podem ocorrer devido à existência conjunta da pectinametilesterase com isoformas ou alguns inibidores, como o íon H_3O^+ formado durante a desmetilação da pectina (BORDENAVE; GOLDBERG, 1993).

Em relação ao grau de maturação e a situação da amostra, percebe-se que as amostras verdes liofilizadas apresentaram resultados mais satisfatórios que as amostras frescas (tanto verde quanto amarela). A atividade de pectinametilesterase é maior em frutos verdes, e diminui à medida que os mesmos amadurecem e secam na planta (ALI et al., 2004). Estudos com grãos de café em diferentes graus de maturação demonstraram que a atividade da pectinametilesterase é maior em frutos verdes e diminui ao longo da maturação (PIMENTA; CHAGAS; COSTA, 2000).

A partir destes resultados, o maracujá verde liofilizado apresentou maior atividade, estatisticamente significativa, em quatro dos métodos utilizados (maior frequência de letras A maiúsculas). Em quase todas as extrações foi possível perceber maior atividade de pectinametilesterase, estatisticamente significativa, no método 5, seguida do método 2 (maior frequência de letras a minúsculas). Sendo assim, houve uma adaptação desses dois métodos (Tabela 3), constituindo um único método que foi utilizado a partir do item 5.3. Nesse novo protocolo foram empregados para a extração da enzima o NaCl e o PVPP (método 5), após a lavagem sucessiva do albedo (método 2) a fim de evitar a formação de um gel devido à quantidade de pectina presente de acordo com Şimşek (2004).

5.3 EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE NaCl

Verificou-se que a presença de NaCl (ou outros sais, mono ou divalentes) é necessária em duas etapas distintas nos trabalhos com pectinametilesterase . A primeira etapa é a extração, para remover a pectinametilesterase da parede celular, e a segunda é na medida de atividade, na qual o sal é adicionado à solução de pectina.

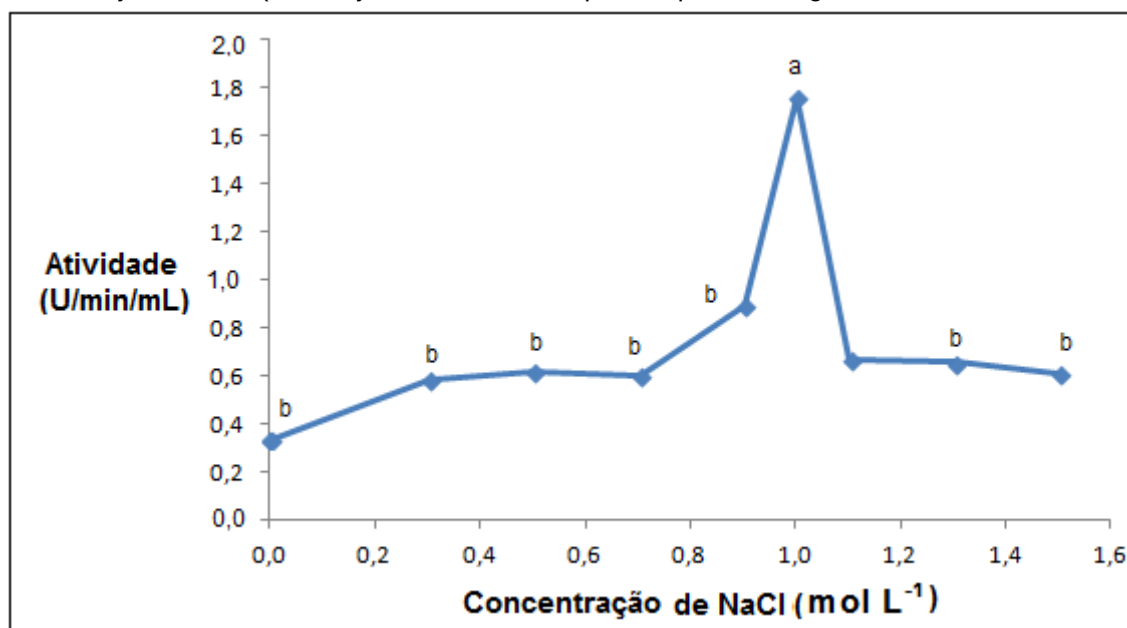
As extrações realizadas para as análises a seguir foram baseadas nos métodos 5 e 2, com lavagens sucessivas da amostra, para a retirada de substâncias solúveis, seguida da extração com solução de 1,0 % de PVPP mais NaCl, sendo este último utilizado em concentrações distintas para o estudo da interação pectinametilesterase -NaCl.

A enzima pectinametilesterase é melhor extraída por força iônica elevada (NaCl 0,1-1,0 mol L⁻¹) em solução tampão de pH alcalino (pH 7-9) (MACDONNELL et al., 1945). Como a maioria dos trabalhos utiliza a concentração de NaCl de 1,0 mol L⁻¹, o efeito da concentração de NaCl na extração da pectinametilesterase foi estudado, para confirmação da melhor concentração. Os resultados desta análise encontram-se expressos na Figura 13, onde é possível comprovar que a concentração de NaCl interfere na solubilização da pectinametilesterase da parede celular até um ponto ótimo, a partir do qual começa a decrescer, concordando com os dados da literatura.

A pectinametilesterase é uma enzima sensível ao ambiente iônico, desta forma, quando enzimas de ponto isoelétrico alcalino estão presentes em um ambiente ácido, são menos ativas, este fato se deve às interações da enzima carregada positivamente e os grupos carboxílicos livres da cadeia de pectina que resultam da atividade enzimática. Ocorre então uma repulsão eletrostática entre as cargas (NARI et al., 1986; BORDENAVE, 1996).

Confirma-se, com esses resultados, que a melhor concentração de NaCl utilizada na extração da pectinametilesterase do albedo de maracujá-amarelo foi 1,0 mol L⁻¹. A melhor concentração de NaCl na extração da pectinametilesterase para cascas de laranja foi de 1,0 g mL⁻¹ do sal (ŞİMŞEK, 2004).

Figura 13 - Efeito da concentração de NaCl na extração de pectinametilesterase de maracujá-amarelo. (Maracujá verde liofilizado; pH 7,5, pectina 10 g L⁻¹ NaCl 1,0 mol L⁻¹, 20 °C).



Houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5 % entre os tratamentos por meio da ANOVA e teste de Tukey (5 %); (Fcalculado: 9,27; Ftabelado: 2,59).

Para Catutani (1982) a atividade enzimática em mamão, aumentou significativamente até a extração com 0,8 mol L⁻¹ NaCl (179,36 PEu), após esta concentração, a atividade permaneceu quase constante com atividade máxima em 1,2 mol L⁻¹ (183,68 PEu), decrescendo em seguida. De acordo com Assis, Martins e Oliveira (2007), a melhor concentração de NaCl encontrada para a acerola foi de 0,6 mol L⁻¹.

Contreras-Esquivel et al. (1999) trabalharam com lima mexicana e *Opuntia sp.* e concluíram que a concentração de NaCl na extração de pectinametilesterase destas variedades vegetais foi diferente. Para lima mexicana, a melhor concentração de NaCl foi de 0,5 mol L⁻¹, apresentando decréscimo com força iônica entre 2,0-3,0 mol L⁻¹, já para *Opuntia sp.*, utilizando 1,0 mol L⁻¹, obtiveram um leve aumento na atividade.

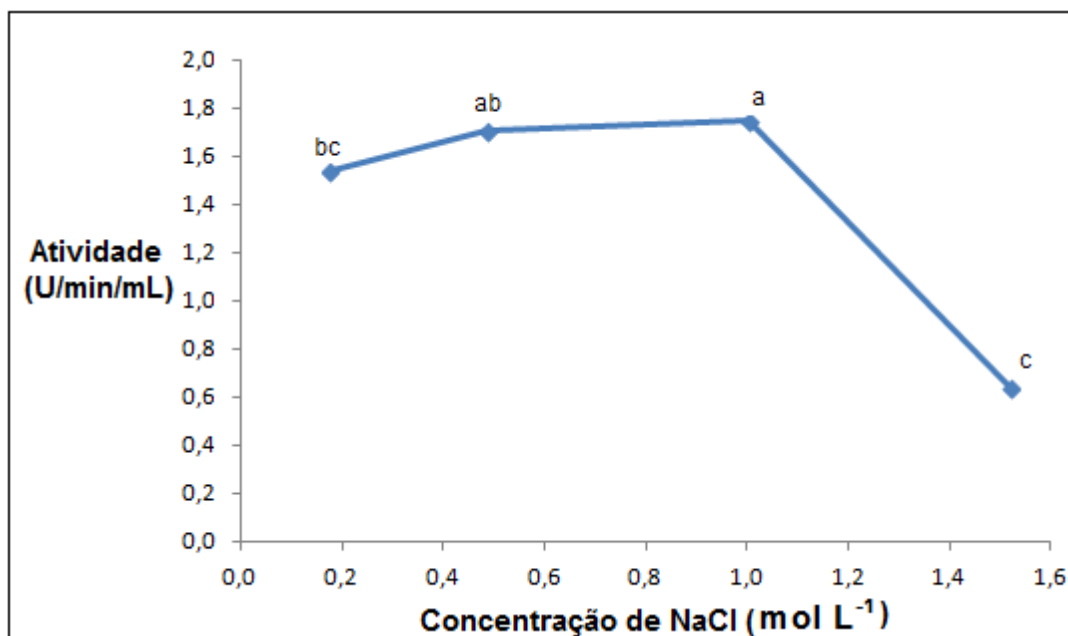
Vilas Boas, Chitarra e Chitarra. (1996) trabalharam com 1,0 mol L⁻¹ na extração de pectinametilesterase de banana prata, assim como Won e Walker (1995) também determinaram a concentração de 1,0 mol L⁻¹ na extração de pectinametilesterase de laranja. Porém, para mamão e graviola, respectivamente, os valores obtidos para a concentração do sal, foram de 1,92 e 2,0 mol L⁻¹ (FAYYAZ et al., 1994; ARBAISAH et al., 1996).

A diminuição na atividade da pectinametilesterase com o aumento da concentração de NaCl se deve ao mecanismo de “salting out” ou precipitação por sais (VIVAR-VERA et al., 2007). Este mesmo autor verificou que para a extração de pectinametilesterase de *C. pubescens* foi necessária uma concentração de 2,0 mol L⁻¹ de NaCl. Antes deste valor (0,5; 1,0 e 1,5) a atividade aumenta significativamente e após este valor (2,5 e 3,0), ela decresce.

Awad e Young (1980) utilizando uma solução de pectina a 0,5 % metade perceberam que a concentração de NaCl que melhor extraiu a pectinametilesterase de amostras de abacate liofilizado foi 0,4 mol L⁻¹.

Com relação ao efeito da concentração de NaCl na medida de atividade da pectinametilesterase, uma vez que esse sal é adicionado à solução de pectina para manter a força iônica da mesma (Figura 14)., a atividade aumenta até uma determinada concentração de sais, a partir da qual ocorre diminuição da mesma.

Figura 14 - Efeito da concentração de NaCl no substrato utilizado na determinação da atividade de pectinametilesterase do extrato bruto de albedo de maracujá-amarelo. (Maracujá verde liofilizado, pH 7,5, pectina 10 g L⁻¹ NaCl 1,0 mol L⁻¹, 20 °C).



Não houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5 % entre os tratamentos por meio da ANOVA e teste de Tukey (5 %); (Fcalculado: 0,19; Ftabelado: 5,14).

Sabe-se que a presença de sais na solução de pectina contribui para o aumento da força iônica da solução, promovendo a solubilização das moléculas de pectinametilesterase ligadas à membrana celular e aumentando a reatividade da

pectinametilesterase com pectinas solúveis. A alta força iônica na solução contendo substrato pode resultar na ativação da enzima solúvel, devido à configuração aberta da molécula da pectinametilesterase (MIYAWAKI, 2006). As pectinametilesterases de origem vegetal têm pH variando entre básico e neutro o que explica a sua interação com a parede celular que é ácida. Estas enzimas mostram-se bastante sensíveis tanto à força iônica quanto ao pH (BORDENAVE, 1996).

A atividade da pectinametilesterase de maracujá-amarelo é dependente da concentração de NaCl, assim como em outras frutas (CASTRO et al., 2004). pectinametilesterase de diferentes fontes vegetais apresentam um comportamento distinto em relação à concentração de NaCl na atividade enzimática (REXOVÁ-BENKOVÁ; MARKOVIC, 1976; PRESSEY; AVANTS, 1972).

Awad e Young (1980), utilizando uma solução de pectina a 0,5 %, perceberam que a concentração de NaCl na qual a pectinametilesterase apresentou melhor atividade foi de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, e o aumento da concentração leva à diminuição gradual da atividade, para amostras de abacate liofilizado. Ainda de acordo com estes autores, soluções de pectina contendo 0,05 ou $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl apresentam aumento da atividade enzimática em 10 %, enquanto que concentrações superiores mostraram-se inibitórios nos ensaios com pectinametilesterase de abacate liofilizado e fresco.

Castro et al. (2004) trabalhando com pectinametilesterase purificada de pimenta verde, concluíram que a atividade enzimática aumenta até $0,13 \text{ mol L}^{-1}$, após os valores referentes à atividade decrescem gradativamente (substrato DE 75 %, 3,5 mg/mL, pH 7.5). De acordo com Nari et al. (1991), na atividade a pectinametilesterase proveniente de cenouras, a concentração ótima de NaCl foi de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Os íons Na^+ induzem um bloqueio dos grupos carboxílicos livres que são necessários para a atividade enzimática (JOLIE et al., 2009). Segundo os autores Rexová-Benková e Markovic (1976) os íons Na^+ , são pré-requisitos para a atividade da pectinametilesterase proveniente de cenouras.

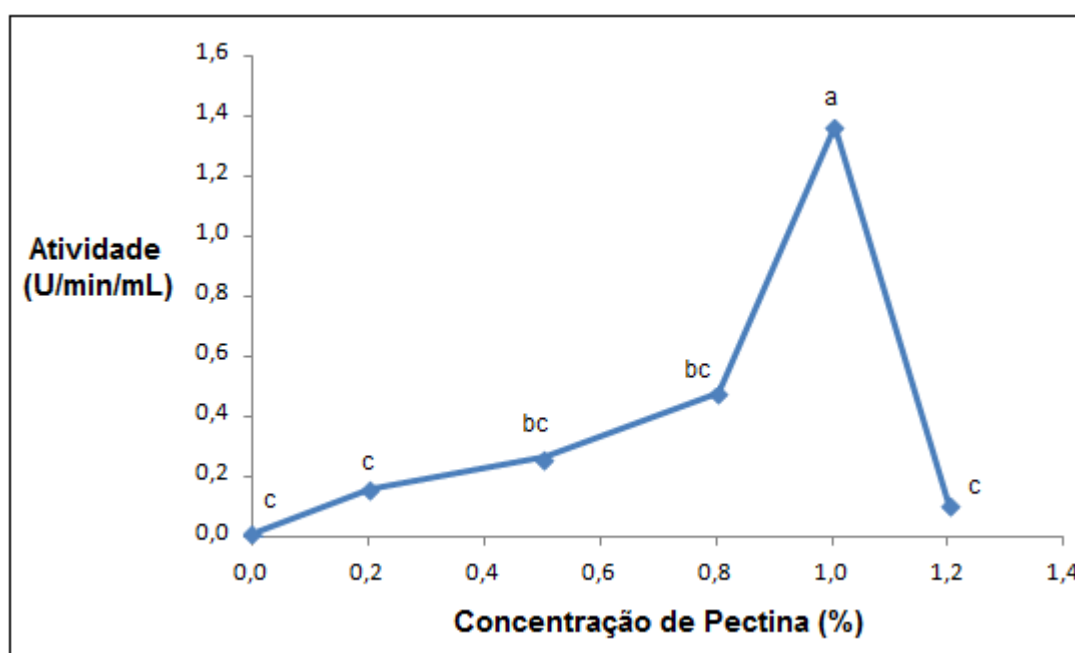
O aumento na atividade se deve a uma ativação da enzima pela interação entre os íons Na^+ com o substrato. O excesso de íons metálicos, no entanto, pode estar relacionado com a diminuição da atividade da pectinametilesterase por inibição da enzima, pois eles podem estar ligados aos grupos carboxilatos, vizinhos às ligações éster e necessários a reação (VIVAR-VERA et al., 2007). Este autor

determinou que a concentração com melhor resultado na atividade do extrato de pectinametilesterase do fruto do espinheiro branco (*Crataegus pubescens*) foi de 0,4 mol L⁻¹, sendo que acima deste valor a atividade diminuiu.

5.4 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE DA PECTINAMETILESTERASE EM EXTRATO BRUTO

Os resultados referentes à concentração de pectina utilizada na medida de atividade da pectinametilesterase encontram-se na Figura 15. É possível perceber que a melhor concentração de substrato encontrada foi de 1,0 % (10 g L⁻¹), com diferença entre as concentrações anterior e posterior (0,8 e 1,2 %, respectivamente).

Figura 15 - Efeito da concentração de pectina na atividade de pectinametilesterase do extrato bruto de albedo de maracujá-amarelo. (Maracujá verde liofilizado, pH 7,5, pectina 10 g L⁻¹ NaCl 1,0 mol L⁻¹, 20 °C).



Houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5 % entre os tratamentos por meio da ANOVA e teste de Tukey (5 %); ($F_{\text{calculado}}$: 16,30; F_{tabelado} : 3,11).

Awad e Young (1980) verificaram que a concentração de pectina no ensaio da atividade da pectinametilesterase de frutos do abacateiro liofilizados, promoveu seu aumento significativamente até 0,25 %, e a partir daí permaneceu constante.

Entretanto, estes autores selecionaram a concentração de 0,5 % como aquela que atingiria o máximo da atividade da pectinametilesterase. Ainda de acordo com estes autores, soluções de pectina contendo 0,05 ou 0,1 mol L⁻¹ NaCl aumenta a atividade enzimática em 10 %, enquanto que concentrações superiores mostraram-se inibitórias nos ensaios com pectinametilesterase de abacate liofilizado e fresco.

Nos ensaios de atividade com pectinametilesterase purificada de pimenta verde, Castro et al. (2004), verificaram que a concentração de pectina (DE 75 %, NaCl 0,117 mol L⁻¹, pH 7,5) afeta a atividade da pectinametilesterase, a medida que a concentração de substrato é elevada a atividade também aumenta até um máximo de 8,0 mg/mL.

Sarmento (2012) utilizou pectina cítrica a 1,0 % diluída em solução de NaCl 0,2 mol L⁻¹ na determinação da atividade de pectinametilesterase de banana 'Princesa', assim como Vilas Boas, Chitarra e Chitarra (1996) também utilizaram esta concentração de pectina cítrica na atividade enzimática, para banana 'Prata' irradiada, porém a concentração de NaCl foi de 0,1 mol L⁻¹.

Para pêssego a concentração ótima foi de 0,01 mol L⁻¹ (ÖZLER; KARAKUS; PEKYARDIMCI, 2008).

Sainz et al. (2004) também utilizaram 1,0 % de pectina na determinação da atividade de pectinametilesterase em extrato bruto obtido de pêssegos.

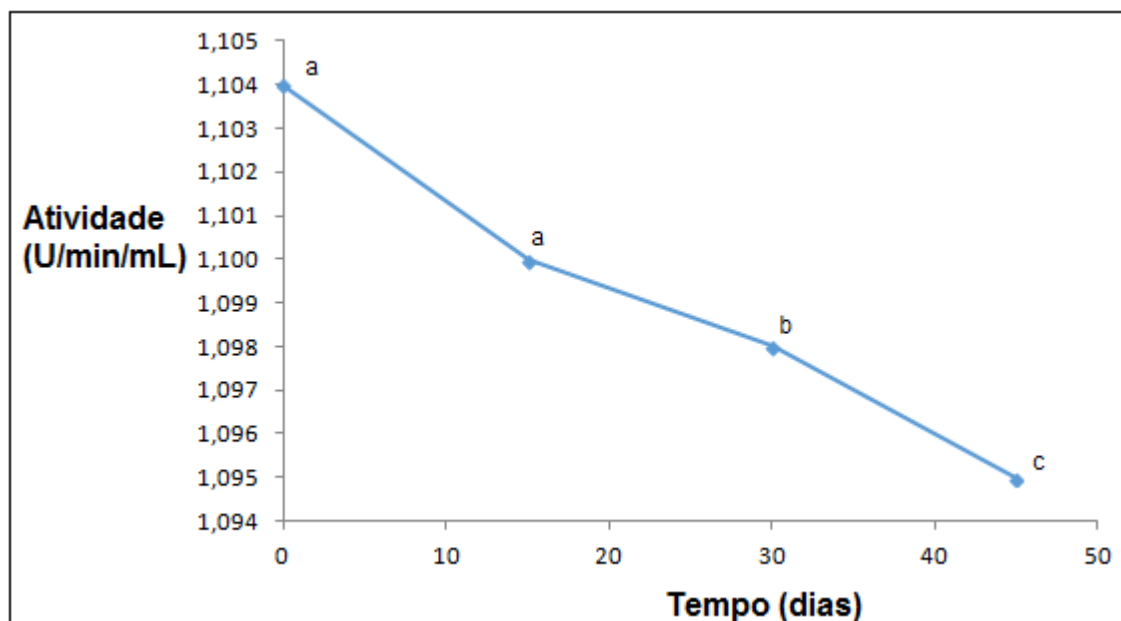
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA PECTINAMETILESTERASE EM EXTRATO BRUTO APÓS PERÍODO DE ARMAZENAMENTO

A refrigeração como forma de armazenamento em pêssegos causa diminuição da atividade da poligalacturonase, responsável por despolimerizar e solubilizar a pectina, enquanto que a enzima pectinametilesterase permanece ativa nesse período, levando ao acúmulo de compostos pécticos de alto peso molecular e baixo grau de metoxilação, que ocorre devido à falta de equilíbrio entre estas enzimas, e estes compostos levam a formação de um gel com a água livre (SASAKI, 2009). Este fenômeno também foi detectado neste trabalho durante os ensaios preliminares, e só foi resolvido devido à realização da tripla lavagem com água, citada por Şimşek (2004), que retira uma quantidade de substâncias solúveis, evitando que ocorra este tipo de comportamento.

A estabilidade da pectinametilesterase durante período de armazenamento em diferentes condições (liofilizado, congelado e refrigerado) foi avaliada neste trabalho (Figuras 16 e 17). Dentre as formas de armazenamento da matéria prima a que apresentou melhores resultados de atividade enzimática foi a liofilização, seguido do congelamento e por último a refrigeração.

A pectinametilesterase do extrato bruto de albedo de maracujá-amarelo da amostra armazenada após o processo de liofilização apresentou diminuição da atividade ao longo dos dias, além de ser um processo de concentração dos sólidos presentes nas amostras, devido à evaporação da água livre.

Figura 16 - Efeito do tempo de armazenamento da matéria-prima liofilizada na atividade da pectinametilesterase. (Maracujá verde liofilizado, pH 7,5, pectina 10 g L⁻¹ NaCl 1,0 mol L⁻¹, 20 °C).



Dia 0 (zero) corresponde a amostra controle-fresca.

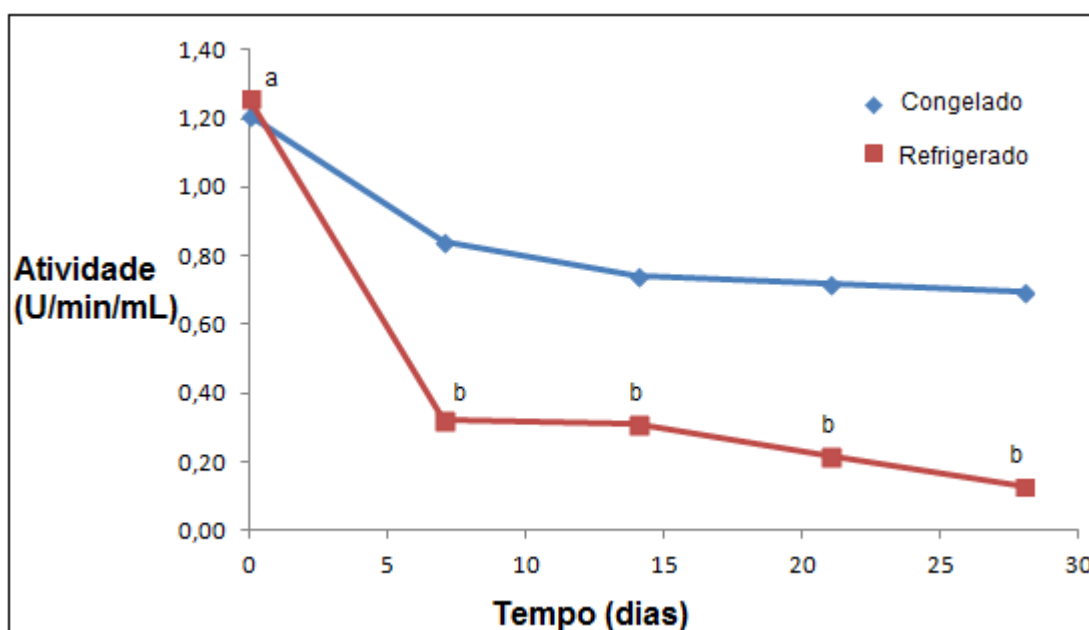
Houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5 % entre os tratamentos por meio da ANOVA e teste de Tukey (5 %); (Fcalculado: 154,95; Ftabelado: 4,07).

Como segunda opção de armazenamento, pode ser indicado o congelamento da matéria-prima, pois foi possível notar que a diminuição da atividade não é acentuada com relação ao armazenamento por refrigeração. A atividade obtida para as amostras congelada e refrigerada, respectivamente, foi de 0,844 e 0,321 U/min/mL. No congelamento após os sete primeiros dias há uma queda de atividade (30,05 %, na atividade, comparada com amostra controle-fresca - 1,206 U/min/mL); porém, ao longo dos dias tende a estabilizar. Nas amostras

refrigeradas, a queda na atividade nos sete primeiros dias, é acentuada (diminuição de 74,5 % na atividade, comparada com amostra controle-fresca - 1,258 U/min/mL), e continua a cair gradativamente até o último dia da análise (28º dia).

Thé et al. (2001) analisaram as modificações enzimáticas (pectinametilesterase e poligalacturonase) em abacaxi em função da temperatura de armazenamento (câmara fria 7 a 10 °C e umidade relativa de 90-93 %, e temperatura ambiente 20 a 22 °C com umidade relativa de 72-90 % por 20 dias) e estágios de maturação e concluíram que as enzimas analisadas estavam presentes nos frutos no ato da colheita, e apenas pectinametilesterase não apresentou mudança na atividade pelo tipo de armazenamento. Os frutos com mais da metade da superfície na cor amarela foram os que apresentaram a maior atividade enzimática.

Figura 17 - Efeito do tempo de congelamento e da refrigeração da matéria-prima na atividade da pectinametilesterase. (Maracujá verde liofilizado, pH 7,5, pectina 10 g L⁻¹ NaCl 1,0 mol L⁻¹, 20 °C).



Dia 0 (zero) corresponde a amostra controle-fresca. Amostra Congelada: Não houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5 % entre os tratamentos ($F_{\text{calculado}}$: 3,14; F_{tabelado} : 3,48). Amostra Refrigerada: Houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5 % entre os tratamentos ($F_{\text{calculado}}$: 167,31; F_{tabelado} : 3,48). Testes estatísticos: ANOVA e teste de Tukey (5 %).

Antunes, Gonçalves e Trevisan (2006) verificaram em amora-preta, que a atividade da enzima pectinametilesterase aumentou durante o período de

armazenamento (0, 3, 6, 9 e 12 dias) nas temperaturas de 2 °C em refrigerador e temperatura ambiente de 20°C±2 °C.

Assis (2000) comparou a atividade da pectinametilesterase em amostras de acerola refrigeradas e congeladas por 24 horas e concluiu que houve uma perda de 39 % na atividade na amostra congelada, sendo desta forma o armazenamento sob-refrigeração a melhor opção.

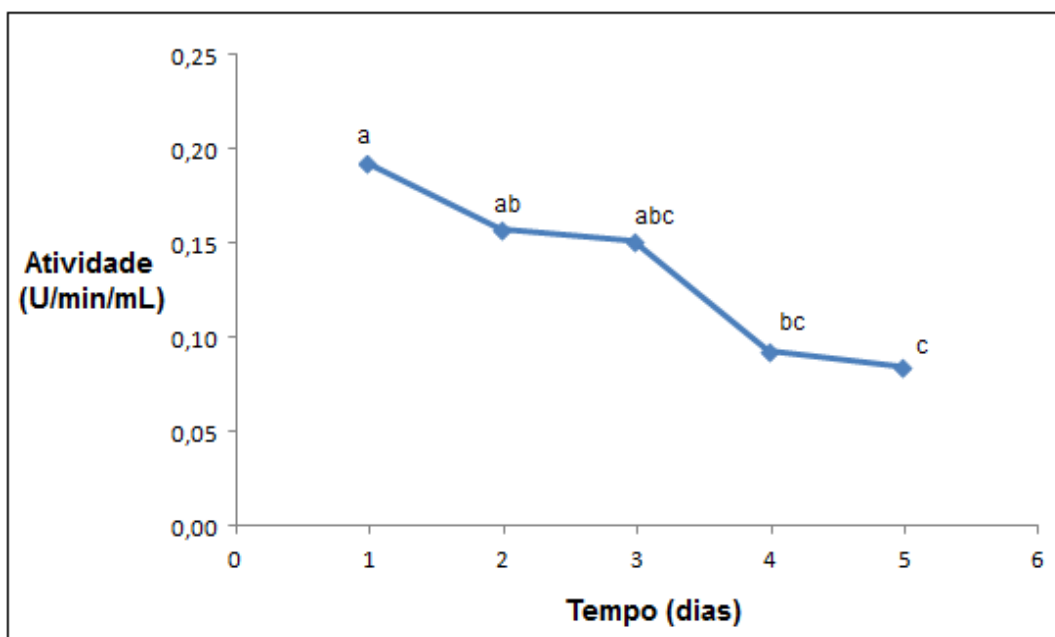
Cardello (1987) estudou a estabilidade da pectinametilesterase purificada de berinjela e verificou que a enzima é mais estável ao congelamento do que a refrigeração, sendo que só houve perda de atividade no período final de análises após 45 dias.

As proteínas são compostos instáveis, tanto química quanto fisicamente, e isto se torna um problema para a sua purificação, formulação e seu armazenamento. Exemplos de tensões capazes de desnaturar proteína são agitação, variação de temperatura e congelamento. Há casos em que métodos que minimizam danos químicos favorecem danos físicos. Como forma de alcançar estabilidade de formulações de proteínas é utilizado o processo de liofilização (PIKAL; SHAH; PUTMAN, 1990; ARAKAWA, et al., 1993 apud SILVA, 2002).

Na Figura 18 encontram-se os resultados encontrados para a atividade da pectinametilesterase presente no extrato bruto do albedo de maracujá-amarelo que foi submetido à refrigeração como um método de conservação para o mesmo. Verifica-se nesses resultados que após a extração, se não houver a adição de agentes que estabilizem o extrato, a enzima presente tende a perder a atividade com tempo de armazenamento.

Karakus e Pekyardımcı (2009) estudaram a estabilidade de pectinametilesterase livres e imobilizadas durante período de armazenamento, os extratos foram armazenados a 4 °C e a atividade medida por trinta dias. Nos primeiros cinco dias, houve perda de atividade de 40 % e 15 % para enzima livre e imobilizada, respectivamente, e continuou a diminuir até o trigésimo dia. A enzima livre foi a que mais reduziu a atividade (75 %) e a enzima imobilizada manteve aproximadamente 50 % de atividade após os trinta dias. Özler, Karakus e Pekyardımcı (2008) verificaram o decréscimo na atividade da pectinametilesterase de pêssegos armazenados por 30 dias a 4 °C.

Figura 18 - Atividade da pectinametilesterase em extrato obtido a partir do albedo de maracujá-amarelo mantido sob-refrigeração.
(Maracujá verde liofilizado, pH 7,5, pectina 10 g L⁻¹ NaCl 1,0 mol L⁻¹, 20 °C).



Dia 1 (um) corresponde ao período de 24 horas de armazenamento.
Houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5 % entre os tratamentos (Fcalculado: 8,71; Ftabelado: 3,48); Testes estatísticos: ANOVA e teste de Tukey (5 %).

Segundo os trabalhos de Şimşek (2004) a pectinametilesterase em extratos podem ser estabilizados utilizando 0,1 % de benzoato de sódio e 0,1 % de benzoato de potássio, proporcionando quase 5 meses de estabilidade a 4 °C.

5.6 ESTUDO DO pH E DA TEMPERATURA ÓTIMOS

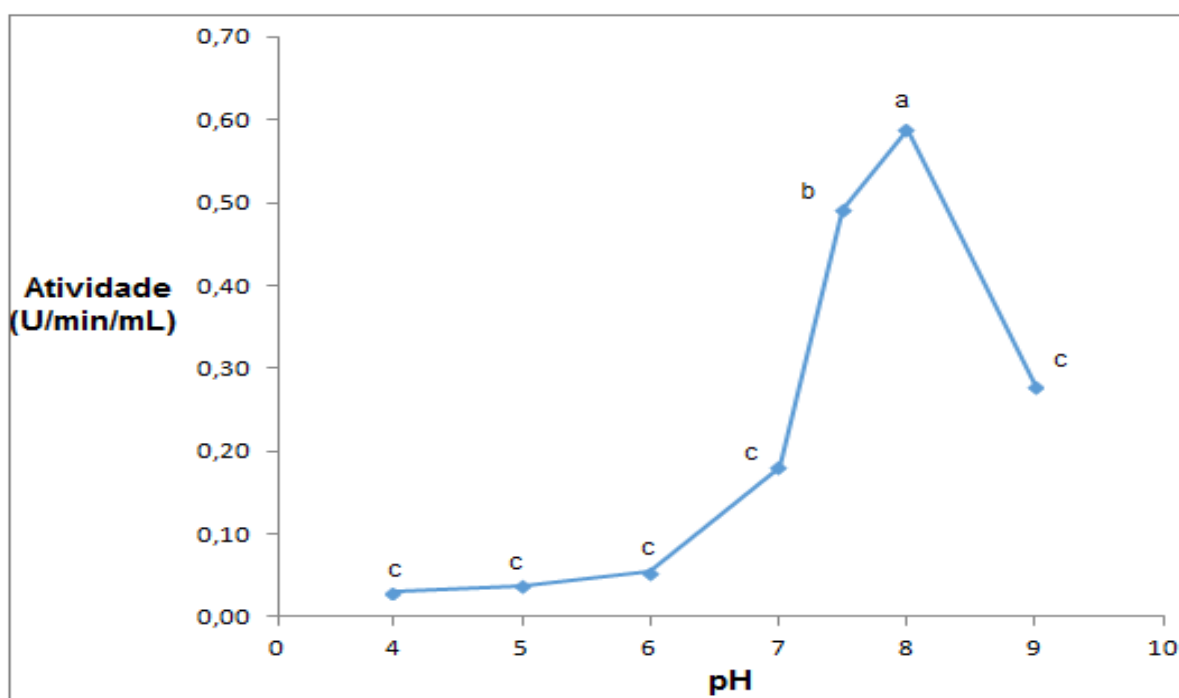
Para a determinação do pH e temperaturas ótimos, os valores utilizados, foram escolhidos baseando-se em pesquisa bibliográfica, onde se verificou o mínimo e o máximo de atividade da pectinametilesterase de diversas frutas, e utilizaram-se estes valores acrescentando um valor para mais e para menos em cada variável, devido ao estudo estar sendo realizado com outra matéria-prima. Os dados obtidos são referentes a atividade da pectinametilesterase *in vitro*.

Na Figura 19 encontram-se os resultados referentes ao efeito do pH na de pectinametilesterase de extrato bruto de albedo de maracujá-amarelo a 20 °C.

O pH ótimo da pectinametilesterase do mamão estudada por Fayyaz et al. (1994) foi de 8, para a graviola o pH ótimo foi 8,4 (ARBAISAH et al., 1996) e goiaba pH 8 (FAYYAZ; ASBI, 1993). Rillo et al. (1992) trabalhando com pectinametilesterase extraída e purificada de uma variedade de laranja (*Mandarin orange*), encontrou pH ótimo de 9, considerado alto para pectinametilesterase, uma vez que os valores de pH variam entre 7-8, desta forma o resultado obtido neste trabalho para a pectinametilesterase de maracujá-amarelo em extrato bruto que foi de 8, encontra-se dentro de um valor aceitável.

Ren e Kernode (2000) trabalharam com a planta *Chamaecyparis nootkatensis* [D. Don] Spach, acompanhando a quebra da dormência das sementes, e a relação com o aumento da atividade da pectinametilesterase, e concluíram que o pH ótimo da pectinametilesterase parcialmente purificada ficou entre 7,4 e 8,4, embora tenha mantido sua atividade por uma longa faixa de pH (7,4-11). Castro et al. (2004) trabalhando com pectinametilesterase purificada de pimenta verde, determinou o pH ótimo de 7,5 (substrato DE 75 %, 3,5 mg/mL, pH 7,5).

Figura 19 - Efeito do pH na atividade de pectinametilesterase de extrato bruto de albedo de maracujá-amarelo. (Maracujá verde liofilizado, pectina 10 g L⁻¹ NaCl 1,0 mol L⁻¹, 20 °C).



Houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5 % entre os tratamentos (Fcalculado: 58,90; Ftabelado: 2,84) por meio da ANOVA e teste de Tukey (5 %).

Javeri e Wicker (1991) purificaram pectinametilesterase de pêssegos e tanto o pH ótimo quanto a estabilidade ao pH, o valor obtido foi de 8.

Karakus e Pekyardımcı (2009) compararam a pectinametilesterase de damasco, sendo uma amostra de enzima livre e outra imobilizada, e identificaram como pH ótimo para a enzima livre foi de 9.0 e para a enzima imobilizada foi de 8 (1,0 % pectina e NaCl 0,2 mol L⁻¹).

Vivar-Vera et al. (2007) encontraram para extrato de pectinametilesterase de *C. pubescens* esta entre 7 e 9 indicando nessa matéria prima que o pH ótimo encontra-se dentro da faixa de pH ótimo da pectinametilesterase de origem vegetal que pode variar entre 7 e 9 (REXOVÁ-BENKOVÁ; MARKOVIC, 1975; MILLER; MACMILLAN, 1970).

Carvalho et al. (2012) extraíram, concentraram e purificaram a pectinametilesterase de resíduos de abacaxi, e determinaram que o pH ótimo tanto para o extrato concentrado quanto o purificado, foi de 8,5, após esse valor a atividade da pectinametilesterase decresce. Amaral, Assis e Oliveira (2005) encontraram que para pectinametilesterase purificada de laranja (cv *Pera-Rio*) o pH ótimo é de 8. Para a enzima purificada de berinjela (CARDELLO; LOURENÇO, 1992) o pH ótimo encontrado também foi de 8. Assis (2000) constatou que o pH ótimo tanto da enzima livre quanto da imobilizada de acerola foi de 9.

O efeito da temperatura sobre a enzima pectinametilesterase também foi analisado (Figura 20), nota-se que à medida que há aumento da temperatura também há aumento da temperatura da atividade da pectinametilesterase até 50 °C, depois tende a diminuir. Os resultados obtidos estão de acordo com os dados da literatura.

Castro et al. (2004) trabalhando com pectinametilesterase purificada de pimenta verde, determinaram a temperatura ótima entre 50-55 °C (substrato DE 75 %, 3,5 mg/mL, pH 7,5). Garcia, Alviar-Agnew, Barrett (2002) determinaram a temperatura ótima de pectinametilesterase de alho e cebola desidratados, de 55 °C, sendo necessário 70 °C para total inativação da enzima.

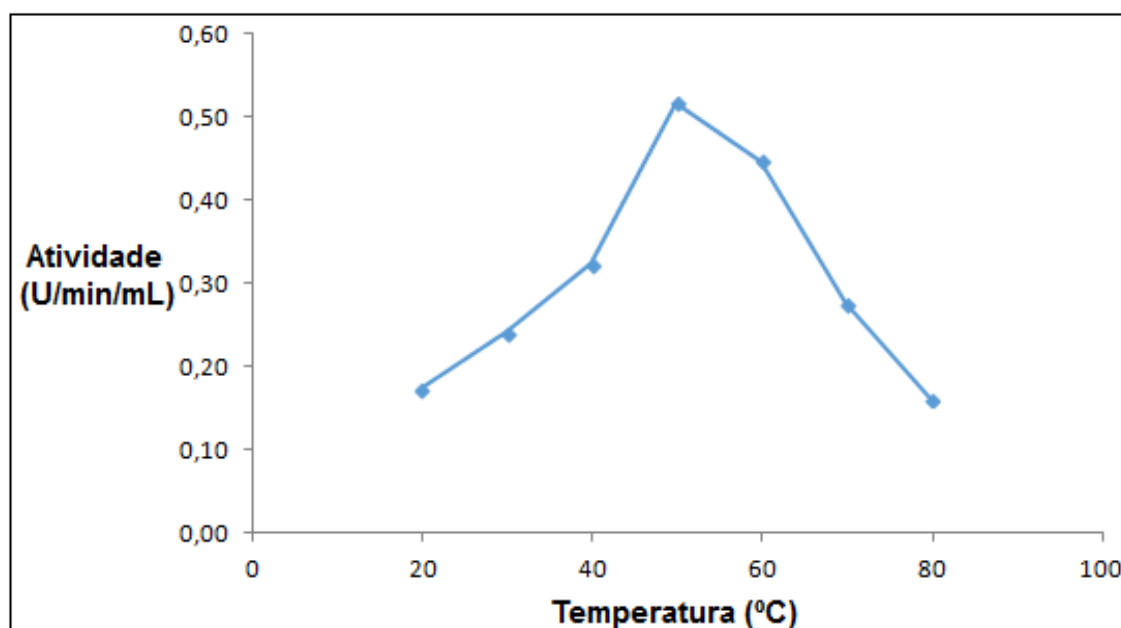
Vivar-Vera et al. (2007) verificaram que no extrato de pectinametilesterase de *C. pubescens*, a atividade aumenta até a temperatura ótima de 55 °C, após diminuiu gradativamente.

Javeri e Wicker (1991) purificaram pectinametilesterase de pêssegos e a temperatura ótima encontrada foi de 60 °C.

Karakus e Pekyardımcı (2009) determinaram que a temperatura ótima para enzima livre e imobilizada, de damasco, foi respectivamente de 60 e 50 °C.

Figura 20 - Efeito da temperatura na atividade de pectinametilesterase do extrato bruto de albedo de maracujá-amarelo.

(Maracujá verde liofilizado, pH 7,5, pectina 10 g L⁻¹ NaCl 1,0 mol L⁻¹).



Não houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5 % entre os tratamentos por meio da ANOVA e teste de Tukey (5 %); ($F_{\text{calculado}}$: 2,60; F_{tabelado} : 2,84).

Carvalho et al. (2012) determinaram que a temperatura ótima da pectinametilesterase de extrato concentrado e purificado de resíduos de abacaxi, foi, respectivamente de 40 e 50 °C.

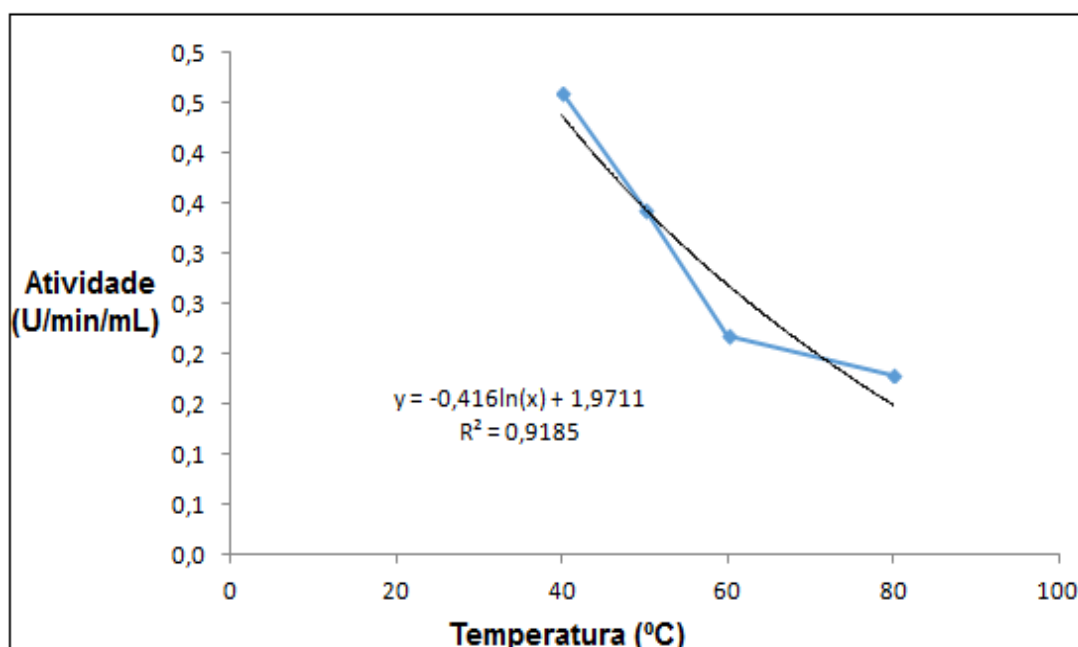
A temperatura ótima encontrada para a pectinametilesterase purificada de laranja (cv *Pera-Rio*) foi de 50 °C (AMARAL; ASSIS; OLIVEIRA, 2005).

De acordo com Assis et al. (2000) a maioria das pectinametilesterases estão ativas nas temperaturas entre 40 e 50°C.

5.7 ESTABILIDADE TÉRMICA DA PECTINAMETILESTERASE PRESENTE EM EXTRATO BRUTO

Os resultados obtidos do estudo da estabilidade térmica da pectinametilesterase do extrato bruto de albedo de maracujá amarelo encontram-se na Figura 21.

Figura 21 - Estabilidade térmica da pectinametilesterase do extrato bruto de albedo de maracujá-amarelo após 10 minutos de incubação.
(Maracujá verde liofilizado, pH 7,5, pectina 10 g L^{-1} NaCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$).



Não houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5 % entre os tratamentos por meio da ANOVA e teste de Tukey (5 %); ($F_{\text{calculado}}$: 1,66; F_{tabelado} : 3,47).

É possível observar que à medida que a amostra é submetida a um aumento gradativo de temperatura, na qual permanece por 10 min, há diminuição da atividade da pectinametilesterase.

As pectinases comerciais são termolábeis (GOMES et al., 2007), necessitando de temperaturas superiores a 70°C para inativação (LY NGUYEN et al., 2002a) enquanto que as naturais são mais termoestáveis. Isto justifica a necessidade do uso de altas temperaturas para completa inativação da pectinametilesterase em extratos naturais.

Rillo et al. (1992) verificaram que a atividade da pectinametilesterase de laranja é constante até temperatura de 40 °C, e a partir deste valor decresce até 90 °C. Este fato é semelhante ao que ocorreu com pectinametilesterase de maracujá-amarelo em extrato bruto. Ren e Kernode (2000) verificaram a estabilidade térmica da pectinametilesterase de *Chamaecyparis nootkatensis* [D. Don] Spach, e concluíram que temperaturas abaixo de 40 °C tem pouco ou nenhum efeito sob a atividade da enzima, porém um aumento na temperatura causa uma rápida diminuição da atividade, não sendo mais detectada a presença da enzima nas temperaturas de 70, 80 e 90 °C.

Castro et al. (2004) estudando pectinametilesterase purificada de pimenta verde, verificaram que para a estabilidade térmica, após 5 min de incubação, 50 % da atividade enzimática já havia sido perdida, e a 70 °C já não foi mais detectada a presença da enzima (substrato DE 75 %, 3,5 mg/mL, pH 7,5).

Vivar-Vera et al. (2007) perceberam que 1 min de aquecimento a 50 °C não afeta a atividade da pectinametilesterase de *C. pubescens*, entretanto o mesmo período nas temperaturas de 70 e 80 °C, levaram a uma perda de atividade de 72,5 e 97,1 %, respectivamente. Carvalho et al. (2012) concluíram que a pectinametilesterase de resíduos de abacaxi são estáveis até 60 °C.

5.8 PRECIPITAÇÃO DA PECTINAMETILESTERASE DO EXTRATO BRUTO COM SULFATO DE AMÔNIO

A fim de determinar qual a melhor faixa de precipitação da enzima pectinametilesterase com sulfato de amônio, realizaram-se os ensaios de acordo com a Tabela 4.

Percebe-se que a maior atividade específica da pectinametilesterase encontra-se na faixa de 40-60 % de sulfato de amônio, fato este que discorda do trabalho de Carvalho et al. (2012), com resíduos (cascas) de abacaxi cv. Pérola, em que a faixa de precipitação ficou entre 60-80 %.

Em alguns trabalhos os autores utilizam uma larga faixa de precipitação do sal, como de 30-70 % (MONDAL et al., 2009), até 80 % (LY-NGUYEN et al., 2002b), de 30-90 % (CARDELLO; LOURENÇO, 1992), até 70 % (ASSIS; MARTINS; OLIVEIRA, 2007), de 20-80 % (JOSHI; PARMAR; RANA, 2011), até 30 % (FAYYAZ

et al. 1994) e 40 % (INARI et al., 2000), isto demonstra que pectinametilesterase de fontes vegetais diferentes apresentam faixas diferentes de precipitação com sulfato de amônio.

Tabela 4 - Atividade da pectinametilesterase extraída de maracujá-amarelo liofilizado, com grau de maturação verde, nas diferentes faixas de precipitação de proteínas através do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Concentração de sulfato de amônio (%)	Atividade Pectinametilesterase (U/min/mL)	Proteína (mg/mL)	AE Pectinametilesterase (U/min/mg proteína)
0-20	2,15	0,89	2,42 ^C
20-40	4,38	1,52	2,88 ^C
40-60	5,78	0,20	28,90 ^A
60-80	2,89	0,18	16,06 ^B
80-90	1,57	3,26	0,48 ^C

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam similaridade estatística por meio da ANOVA e Teste de Tukey a 5 % de significância.

Sendo assim, a faixa escolhida para prosseguir com as análises é a faixa entre 40-60 %, e não outra faixa mesmo com presença de atividade, para evitar diluir a enzima, misturando-a com outras proteínas precipitadas nas respectivas faixas.

6 CONCLUSÕES

Foi possível detectar a atividade enzimática correspondente à pectinametilesterase em albedo de maracujá-amarelo.

Os cinco métodos de extração testados influenciaram na atividade da enzima, porém em nível estatístico as diferenças foram pequenas ou não existiram.

A amostra liofilizada apresentou maior atividade enzimática que a amostra fresca. Em relação ao grau de maturação, a maior atividade foi obtida em amostras em estágio verde. Sendo

A concentração ideal do NaCl, tanto para o processo de extração quanto na determinação da atividade, foi de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. A concentração de pectina como substrato também interferiu na atividade enzimática, resultando a concentração de 1,0 % como a mais indicada.

Concluiu-se que os melhores resultados referentes ao período de armazenamento da matéria-prima, quanto à atividade da enzima, foram encontrados nas amostras liofilizadas, seguidas das congeladas e por último as refrigeradas.

Com relação ao armazenamento do extrato bruto observou-se o decréscimo da atividade da com o passar dos dias.

O pH ótimo e a temperatura ótimos da enzima foram determinados em extrato bruto obtido de amostra verde liofilizada, tendo como resultado pH 8 e temperatura de 50 °C.

Um aquecimento a 80 °C por 10 min não foi suficiente para a inativação completa da enzima, demonstrando ser necessário utilizar temperatura mais elevada que essa para inativá-la completamente.

A etapa inicial de purificação de proteínas foi iniciada com a precipitação com sulfato de amônio com a melhor faixa de precipitação para pectinametilesterase na concentração de 40-60 %.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, O. M.; LOZANO, S. E.; OCAMPO, M. A.; TORRES, K. B.; MARTÍNEZ, A.V.; APARICIO, A. J. Cambios en la actividade de α -amilasa, PME e PG durante la maduración del maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* var. flavicarpa Deg.). **Revista de Ciência y Tecnología de America**, v. 31, n. 10, p. 728-733, out. 2006.
- ALI, Z. M.; CHIN, L.; MARIMUTHU, M.; LAZAN, H. Low temperature storage and modified atmosphere packaging of carambola fruit and their effects on ripening related texture changes, wall modification and chilling injury symptoms. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 181-192, 2004.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J. SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 21-28, jan. 1998.
- ALONSO, J.; HOWELL, CANET, W. Purification and Characterisation of Two Pectinmethylesterase from Persimmon (*Diospyros kaki*). **Journal of Science Food Agricultural**, 75, p. 352-358, 1997.
- AMARAL, S. H.; ASSIS, S. A.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Partial purification and characterization of pectin methylesterase from orange (*Citrus sinensis*) cv. perarrio. **Journal of Food Biochemistry**, v. 29, p. 367–380, 2005.
- ANTUNES, L. E. C.; GONÇALVES, E. D.; TREVISAN, R. Alterações da atividade da poligalacturonase e pectinametilesterase em amora-preta (*Rubus* spp.) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 1, p. 63-66, jan./mar. 2006.
- ARBAISAH, S. M.; ASBI, B. A.; JUNAINAH, A. H.; JAMILAH, B. Determination of optimum conditions for pectinesterase extraction from soursop fruit (*Anona muricata*) using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 289-292, 1996.
- ASSIS, S. A. **Enzima Pectimetilesterase de acerola (*Malpighia glabra* L.); estabilidade térmica e imobilização**. 2000. 96f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Instituto de Química, 2000.
- ASSIS, S. A.; MARTINS, A. B. G.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Purification and characterization of pectin methylesterase from acerola (*Malpighia glabra* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.87, n. 1, p. 1845–1849, ago. 2007.
- AWAD, M.; YOUNG, R. E. Avocado Pectinmethylesterase Activity in Relation to Temperature, Ethylene, and Ripening. **Journal of the American Society Horticultural Science**, v.105, n.5, p. 638-641, 1980.
- AZEVEDO, M. L. **Extração de RNAs e perfil transcricional de enzimas que participam da degradação de parede celular em pêssegos cv. Chiripá após armazenamento**. 2008. 71f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia

Agroindustrial). Universidade Federal de Pelotas, 2008. Disponível em <http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&o_obra=115620>. Acesso em: 7 out. 2012.

BASANTA, M. F.; PONCEA, N. M. A.; ROJAS, A. M.; STORTZA, C. A. Effect of extraction time and temperature on the characteristics of loosely bound pectins from Japanese plum. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 230-235, jun. 2012.

BENEN, J. A. E.; VAN ALEBEEK, G. J. W. M.; VORAGEN, A. G. J. 2003. Pectic esterases. In: WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D.W.S. **Handbook of food enzymology**. New York: Marcel Dekker. p. 849-856.

BIBVIRT – **Biblioteca Virtual do Estudante** – USP – Universidade de São Paulo (2005). Disponível em <<http://www.bibvirt.futuro.usp.br/especiais/frutasnobrasil>>. Acesso em: 16 jun. 2012.

BLANCO, P.; SIEIRO, C. VILLA, T. G. Production of pectic enzymes in yeasts: minireview. **FEMS Microbiology Lett**, v. 175, n. 1, p 1-9, jun. 1999.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento dos Alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 152p.

BORDENAVE, M. Analysis of pectin methyl esterases. **Plant cell wall analysis**, Springer-Verlag, 165–80, 1996.

_____; GOLDBERG, R. Purification and characterization of pectin methylesterases from mung bean hypocotyl cell walls. **Phytochemistry**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 999-1003, 1993.

BORRIS, R. Biology of enzymes. In: REHM, H. J.; REED, O. G., (Ed.). **Biotechnology**. 7ª edição. Weinheim: VCH, 1987.

BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001.

BURNS, J. K.; PRESSEY, R. Ca²⁺ in cell walls of ripening tomato and peach. **Journal of American fou Horticultural Science**, v. 112, p. 783-787, 1987.

CABRAL, L. M. C.; FREIRE JÚNIOR, M.; DA MATTA, V. M. Suco de maracujá. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. p. 293-307.

CANTERI, M. H. G. **Caracterização comparativa entre pectinas extraídas do pericarpo de maracujá-amarelo (Passiflora edulis f. flavicarpa)**. Universidade Federal do Paraná - Université D'avignon Et Pays De Vaucluse. 2010. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos e Docteur en Science des Procédés, Sciences des Aliments). Curitiba, 2010, 162f. Disponível em <<http://www.posalim.ufpr.br/Pesquisa/pdf/TeseCANTERI.pdf>>. Acesso em: 4 abr. 2012.

CANTERI M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2,18-24, 2001.

CARDELLO, L.; LOURENÇO; E. J. Purificação Parcial e caracterização da pectinesterase de berinjela. **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, 4: 111-123, 1992.

CARVALHO, E. A.; MELO NETO, B. A.; HOLSCHUH, H. J.; FRANCO, M.; SACRAMENTO, C. K. Extração e caracterização de pectinametilesterase (PME) de resíduos agroindustriais de abacaxi 'Pérola'. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2257-2266, nov./dez. 2012.

CASTILHO, L. R.; COELHO, M. A. Z; COURI, S.; LEITE, S. G. F.; MEDRONHO, R. A. Escolha de linhagens de *Aspergillus niger* para a produção de pectinases e caracterização do complexo enzimático obtido. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 11, Rio de Janeiro. **Anais ...**, Rio de Janeiro: [s.n.], 1996, p.1466-1471.

CASTRO, S. N. M.; LOEY, A. V.; SARAIVA, J. A. SMOUT, C.; HENDRICKX, M. Activity and Process Stability of Purified Green Pepper (*Capsicum annuum*) Pectin Methylesterase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52,5724-5729, 2004.

CATUTANI, A. T. **Pectinesterase do mamão (*Carica papaya* L.)**. Dissertação (Mestre em Ciências), 76 p., 1982. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1982.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2ª ed. Lavras: ESAL/FAEPE, 2005.

COELHO, A. A.; CENCI, S. A.; RESENDE, E. D. Qualidade do suco de maracujá-amarelo em diferentes pontos de colheita e após o amadurecimento. **Ciência Agrotec.**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 722-729, 2010.

COHEN, K. O.; COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D. PAES, N. S.; SOUSA, H. N.; CAMPOS, A. V. S.; SANTOS, A. L. B.; SILVA, K. N.; FALEIRO, F. G.; FARIA, D. A.; SOBRAL, L. Determinação da características físico-químicas e funcionais de espécies de maracujá-doce. **IX Simpósio Nacional Cerrado e II Simpósio Internacional de Savanas Tropicais**. Brasília, DF, 2008. Disponível em <www.cpac.embrapa.br/download/648/t>. Acesso em: 25 maio 2012.

COLIN-HENRION, M. **De la pomme à la pomme transformée: impact du procédé sur deux composés d'intérêt nutritionnel**. 2008. 299f. Tese (Ciências Agrônômicas) - École Doctorale D'Angers-Universidade d'Angers, 2008. Disponível em <http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/35/11/79/PDF/These_Muriel_RectoVerso.pdf> acesso em 16-mai-2012.

CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; CORREA-ROBLES, C.; AGUILAR, C. N.; RODRIGUEZ, J.; ROMERO, J.; HOURS, R. A. Pectinesterase extraction from Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) and prickly pear (*Opuntia cusindica* L.) peels. **Food Chemistry**, v. 65, n. 2, 153-156, maio 1999.

CORREDIG, M.; KERR, W.; WICKER, L. 2001. Separation of thermostable pectinmethylesterase from marsh grapefruit pulp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, 4918-4923, 2000.

DELINCEE, H.; RADOLA, B. J. Some size and charge properties of tomato pectin methylesterase. **Biochemistry Biophys Acta**, v. 214, n. 1, p. 178-189, jul. 1970.

DE MARCHI, R.; MONTEIRO, M.; BENATO, E. A.; SILVA, C. A. Uso da cor da casca como indicador de qualidade do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) destinado à industrialização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n.3, Campinas Set./Dez. 2000.

DENE'S, J. M.; BARON, A.; DRILLEAU, J. F. Purification, properties and heat inactivation of pectin methylesterase from apple (cv Golden Delicious). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1503-1509, 2000.

DIAS, M. V.; BORGES, S. V.; OLIVEIRA, L. F.; NASCIMENTO, R. M.; CAMILLOTO, G. P. Aproveitamento do albedo do maracujá na elaboração de doce em massa e alterações com o armazenamento. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 22, n. 1, p. 71-78, jan./mar. 2011.

DICIONÁRIO DO AURÉLIO BETA. Disponível em <<http://www.dicionariodoaurelio.com/Antese.html>> Acesso em 30 nov. 2013.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Perguntas e Respostas:** Maracujá. Disponível em <http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=perguntas_e_respostas-maracuja.php>. Acesso em 17 maio 2012.

FAYYAZ, A.; ASBI, B. A. Pectinesterase extraction from guava. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 16, n. 3, p. 223-224, 1993.

FAYYAZ, A.; ASBI, B. A.; GHAZALI, H. M.; CHE MAN, Y. B.; JINAP, S. Purification and molecular properties of papaya pectinesterase. **Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 373-378, 1994.

FIGUEIREDO, L. P.; VALENTE, W. A.; DIAS, M. V.; BORGES, S. V.; PEREIRA, P. A. P.; PEREIRA, A. G. T.; CLEMENTE, P. R. Efeito da adição de suco de maracujá e tempo de cozimento sobre a qualidade de doces do albedo de maracujá em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 840-846, dez. 2009.

FONTES, R. V.; SANTOS, M. P.; FALQUETO, A. R.; SILVA, D. M. Atividade da pectinametilesterase e sua relação com a perda de firmeza da polpa de mamão cv. Sunrise Solo e Tainung. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 54-58, mar. 2008.

FU, J. T.; RAO, M. A. Rheology and structure development during gelation of low-methoxyl pectin gels: the effect of sucrose. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 1, p. 93-100, jan. 2001.

FUJITA, E.; VIEITES, R. L.; CAMPOS, A. J. Avaliação enzimática na pós-colheita do maná cubiu tratados com radiação gama. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 6, n. 1, p. 53-58, 2012.

FUNCIONAIS E NUTRACEUTICOS. Enzimas Catalisadoras de Reações Biológicas. **Revista Insumos**, n. 86, p.20-29, 2012. Disponível em <http://www.insumos.com.br/funcionais_e_nutraceuticos/materias/86.pdf>. Acesso em 05 nov. 2012.

GAMARRA ROJAS, G.; MEDINA, V. M. Mudanças bioquímicas do suco do maracujá- amarelo em função da idade do fruto. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.18, n.1, p. 75-83, 1996.

GONZALEZ, S. L. **Determinação da atividade da pectina metilesterase em pectinases industriais e a atividade residual exógena no suco de manga.** Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2009, 93f.

GARCIA, E.; ALVIAR-AGNEW, M.; BARRETT, D. M. Residual pectinesterase activity in dehydrated onion and garlic products. **Journal of Food Processing Preservation**, v. 26, p. 11-26, 2002.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GUMMADI, S. N.; KUMAR, D. S. Microbial pectic transliminases. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 27, n. 7, p. 451-458, abr. 2005.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 987–996, fev. 2003.

HAGERMAN, A. E.; AUSTIN, P. J. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 440–444, 1980.

HARRIMAN, R.W.; TIEMAN, D. M.; HANDA, A. K. Molecular cloning of tomato pectin methylesterase gene and its expression in Rutgers, ripening inhibitor, non ripening, and Never Ripe tomato fruits. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, p. 80-87, 1991.

HERRON, S. R.; BENEN, J. A.; SCAVETTA, R. D.; VISSER, J.; JURNAK, F. Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. **Proceeding of the National Academy Science**, USA, v. 97, n. 16, 8762-8769, ago. 2000.

HOONDAL, G. S.; TIWARI, R. P.; TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q. K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Appl Microbiology Biotechnology**, v. 59, n. 4-5, p. 409-418, 2002.

HOURDET, D.; MULLER, G. Solution properties of pectin polysaccharides-III: Molecular size of heterogeneous pectin chains. Calibration and application of SEC to pectin analysis. **Carbohydrate Polymer**, v. 16, n. 4, p. 409-432, 1991. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014486179190059L>>. Acesso em: 25 abr. 2012.

HUISMANN, M. M. H.; OOSTERVELD, A.; SCHOLS, H. A. Fast determination of the degree of methyl esterification of pectins by head-space GC. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 4, p. 665-668, jul. 2004.

INARI, T.; TAKEUCHI, T.; TOMOEDA, M. Pectinesterase activity during the ripening stage from strawberry. **Gifu Joshi Daigaku Kiyo**, v. 25, p. 31-37, 1996.

_____; YAMAGUCHI, R.; KATO, K.; TAKEUCHI, T. Purification and some properties of pectinesterase from fruits of a miniature-fruited red type tomato. **Food Science Technology**, v. 6, p. 54-58, 2000.

IPPA - Internation Pectin Producers Association. **What is pectin?** 2001. Disponível em <http://www.ippa.info/what_is_pectin.htm> acesso em: 27 abr. 2012.

ISHIMOTO, F. Y.; HARADA, A. I.; BRANCO, I. G.; CONCEIÇÃO, W. A. S.; COUTINHO, M. R. Aproveitamento Alternativo da Casca do Maracujá-Amarelo (*Passiflora edulis* f. var. *flavicarpa* Deg.) para Produção de Biscoitos. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 9, n. 2, jul./dez. 2007.

JAKÓB, A.; BRYJAK, J.; POLAKOVIČ, M. Selection of a method for determination of activity of pectinolytic enzymes in berry fruit materials. **Chemical Papers**, v. 63, n. 6, p. 677-682, mai. 2009.

JARVIS, M.C. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. **Plant Cell Environment**, v. 7, n. 3, p. 153-164, abr. 1984.

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

JAVERI, H.; WICKER, L. Partial purification and characterization of peach pectinesterase. **Journal of Food Biochemistry**, v. 15, p. 241-252, 1991.

JOLIE, R. P.; DUVETTER, T.; LOEY, A. M. V.; HENDRICKX, M. E. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 2583-2595, 2010.

JOSHI, V. K.; PARMAR, M.; RANA, N. Purification and characterization of pectinase produced from Apple pomace and evaluation of its efficacy in fruit juice extraction and clarification. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 2, n. 2, p. 189-197, jun. 2011.

KARAKUS, E.; PEKYARDIMCI, S. Immobilization of apricot pectinesterase (*Prunus armeniaca* L.) on porous glass beads and its characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 13–19, 2009.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresour Technology**, v. 77, n. 3, p. 215-227, maio 2001.

KERTESZ, Z. I. Pectic enzymes. In: COLOWICK, S. P.; KAOLAN, N. O. **Methods in Enzymology**. 1st ed. New York: Academic Press, 1955, p. 158-162.

KLUGE, R. A.; NACHTIGAL, J. C.; FACHINELLO, J. C.; BILHALVA, A. B. **Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado**. Campinas: Rural Ltda, 2002.

LARATTA, B. LOIUDICE, R.; GIOVANE, A.; QUAGLIUOLO, L.; SERVILLO, L.; CASTALDO, D. Thermostability of three pectinesterase isoenzymes in tomate fruit. **Food Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 415-418, 1995.

LANZARINI, G.; PIFFERI, P.G. Enzymes in the fruit juice industry. In: CANTARELLI, C.; LANZARINI, G. **Biotechnology applications in beverage production**. London: Elsevier Applied Science, 1989, p. 189-222.

LEITÃO, M. C. A., ALARCÃO SILVA, M. L., JANUÁRIO, M. I. N., AZINHEIRA, H. G. Galacturonic acid in pectic substances of sunflower head residues: quantitative determination by HPLC. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, n. 3, p. 165-169, 1995.

LIMA, L. C. O.; SCALON, S. P. Q.; SANTOS, J. E. S. Qualidade de mangas (*Mangifera indica*) cv. 'Haden' embaladas com filme de PVC durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 18, n. 1, p. 55-63, 1996.

LOURENÇO, E. J. CATUTANI, A. T. Purification and properties of pectinesterase from papaya. **Journal of the Science of Food and Agricultural**, v. 35, n. 10, p. 1120-1127, out. 1984.

LY-NGUYEN, B.; VAN LOEY, A. M.; FACHIN, D.; VERLENT, I.; DUVETTER, T.; VU, S. T.; SMOUT, C.; HENDRICKX, M. E. Strawberry pectin methylesterase: purification, characterization, thermal and high-pressure inactivation. **Biootechnology Progress**, v. 18, n. 6, p. 1447-1450, nov./dez. 2002a.

LY-NGUYEN, B.; VAN LOEY, A.; FACHIN, D.; VERLENT, I.; HENDRICKX, I. M. Purification, Characterization, Thermal, and High-Pressure Inactivation of Pectin Methylesterase from bananas (cv. Cavendish). **Biotechnology and Bioengineering**, v.78, n. 6, p. 683-691, jun. 2002b.

MACHADO, S. S.; CARDOSO, R. L.; MATSUURA, F. C. A. U.; FOLEGATTI, M. I. S. Caracterização física e físico-química de frutos de maracujá amarelo provenientes

da região de Jaguaquara-Bahia. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 15, n. 02, jul./dez. 2003.

MARTINS, E. S. **Purificação e caracterização bioquímica de Poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido**. 2006, 119f. Tese (Doutor em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências. Rio Claro, 2006. Disponível em <<http://www.acervodigital.unesp.br/handle/123456789/51564?mode=full>>. Acesso em: 15 set. 2012.

MAY, C. D. Industrial pectins: sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, p.79-99, 1990.

MCDONNELL, L. R.; JANSEN, E. F.; LINEWEAVER, H. The properties of orange pectinesterase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 6, p. 389-401, 1945

MCNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Reviews Biochemistry**, v. 53, p. 625-663, 1984.

MILLER, L.; MACMILLAN, J. D. Mode of action of pectic enzymes. II. Further purification of exopolygalacturonate lyase and pectinesterase from *Clostridium multifementans*. **Journal of Bacteriology**, v. 102, p. 72-78, 1970.

MIYAIRI, K.; OKUNO, T.; SAWAI, T. Purification and some properties of pectinesterase from apple fruit. **Hirosaki Daigaku Noho**, v. 24, p. 22-30, 1975.

MIYAWAKI, M. **Control of polyphenol oxidase and pectin methylesterase activities by ultra high pressure**. Washington State University, 2006. Dissertação (Doctor of Philosophy), Washington State University, Department of Food Science and Human Nutrition, 2006. Disponível em <http://research.wsulibs.wsu.edu/xmlui/bitstream/handle/2376/457/M_Miyawaki_033106.pdf?sequence=1>. Acesso em: 18 maio 2012.

MONDAL, K.; MALHOTRA, S. P.; JAIN, V.; SINGH, R. Partial purification and characterization of pectinmethylesterase from ripening guava (*Psidium guajava* L.) fruits. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 1, p. 81–87, 2009.

MUNHOZ, C. L.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; SOARES-JÚNIOR, M. S. Extração de pectina de goiaba desidratada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 2008.

NARI, J.; NOAT, G.; DIAMANTIDIS, G.; WOULDSTRA, M.; RICARD, J. Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. 3. Interplay between limited cell-wall autolysis, pectin methyl esterase activity and electrostatic effects in soybean cell walls. **European Journal of Biochemistry/FEBS**, v. 155, p. 199-202, 1986.

OLIVEIRA, L. F.; NASCIMENTO, M. R. F.; BORGES, S. V.; RIBEIRO, P. C. N.; RUBACK, V. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) para produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 3, n. 22, p. 259-262, set./dez. 2002.

ÖZLER, A.; KARAKUS, E.; PEKYARDIMCI, S. Purification and Biochemical Characteristics of Pectinesterase from Malatya Apricot (*Prunus armeniaca* L.). **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 38, p. 358–375, 2008.

PARK, J. K.; ANTONIO, C. G.; OLIVEIRA, A. R.; PARK, B. J. K. **Seleção de Processos e Equipamentos de Secagem**. Unicamp. Palestra 01/ago/2006.

PIKAL, M. J.; SHAH, S.; PUTMAN, R. The Secondary drying stage of freeze-drying: Drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. **International Journal of Pharmaceutics**. N. 60, p. 203-217, 1990.

PIMENTA, C. J.; CHAGAS, S. J. R.; COSTA, L. Pectinas e enzimas pectinolíticas em café (*Coffea arabica* L.) colhido em quatro estágios de maturação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 4, p. 1079-1083, out./dez. 2000.

PINTO, L. K. A. **Transformações bioquímicas do mamão cv Golden armazenado sob refrigeração em atmosfera controlada**. 2009. 89f. Tese (Doutor em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2009. Disponível em <http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/PRODVEGETAL_3434_1280430223.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2013.

PRESSEY, R.; AVANTS, J. K. Multiple forms of pectinesterase in tomatoes. **Phytochemistry**, v. 11, n. 11, p. 3139-3142, nov. 1972.

_____. Solubilization of cell walls by tomato polygalacturonases: effects of pectinesterases. **Journal of Food Biochemistry**, v.1, n.6, p.57-74, 1982.

REN, C.; KERMODE, A. R. An Increase in Pectin Methyl Esterase Activity Accompanies Dormancy Breakage and Germination of Yellow Cedar Seeds. **Plant Physiology**, setembro, v. 124, p. 231–242, 2000.

REOLON, C. A.; BRAGA, G. C.; SALIBE, A. B. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo em diferentes estádios de maturação. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 27, n. 2, p. 305-312, jul./dez. 2009.

REXOVÁ-BENKOVÁ, L.; MARKOVIC, O. Pectic Enzymes. **Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry**, v. 33, p. 323-385, 1976.

RILLO, L.; CASTALDO, D.; GIOVANE, J. A.; SERVILLO, L.; BALESTRIERI, C.; QUAGLIUOLO, C. Purification and Properties of Pectin Methyl Esterase from Mandarin Orange Fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 591-593, 1992.

ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Pectic enzymes. In: ROSE, A. H. Ed. **Economic Microbiology: Microbial Enzymes and Bioconversions**. London: Academic Press, 1980, p-227-282.

ROSENBOHM, C.; LUNDT, I.; CHRISTENSEN, T.M.I.E.; YOUNG, N.W.G. Chemically methylated and reduced pectins: Preparation, characterization by ^1H NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 7, p. 637–649, mar. 2003.

SÁENZ, J. M.; TÉLLEZ, A.; GARZA, H.; REYES, M. L.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR, C. N. Purification and some properties of pectinesterase from potato (*Solanum tuberosum* L.) alpha cultivar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, n. 4, 2000.

SAINZ, R. L.; SILVA, E. B.; VENDRUSCOLO, J. L.; ANTUNES, P. L.; TORALLES, R. P.; Silva, R. S. Determinação do pH Ótimo De Extração de Pectinametilesterases em Pêssegos (*Prunus persica*) cv.ELDORADO. In: XIII Congresso de Iniciação Científica e VI Encontro e Pós-Graduação, 2004, Pelotas - RS. **Anais do XIII Congresso de Iniciação Científica e VI Encontro de Pós-Graduação**. Pelotas: UFPel, 2004. Disponível em <www2.ufpel.edu.br/cic/2004/arquivos/CA_01314.rtf>. Acesso em: 27 jul. 2012.

SALOMÃO, L. C. C.; VIEIRA, G.; MOTA, W. F. Tecnologia de colheita e pós-colheita. In: Bruckner, C. H.; Picanço, M. C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 283-303.

SANTI, L. **Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais**. 2005, 90f. Dissertação (Mestre em Biologia celular e molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/8517>. Acesso em: 24 maio 2012.

SARMENTO, C. A. R. **Determinação do ponto de colheita e avaliação da pós-colheita de banana princesa utilizando biofilme**. 2012, 74f. Dissertação (Mestre em Agrossistemas). Universidade Estadual de Sergipe, São Cristóvão, 2012. Disponível em <http://bdtd.ufs.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=783>. Acesso em: 26 jan. 2013.

SASAKI, F. F. **Tratamentos térmicos, cloreto de cálcio e atmosfera modifica em pêssegos 'IAC Douradão': aspectos fisiológicos, bioquímicos e de qualidade**. 2009. Tese (Doutor em Ciências). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiros", Piracicaba, 2009. Disponível em <www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/...09092009.../Fabiana_Sasaki.pdf>. Acesso em: 17 maio 2013.

SCHELLER, H. V.; JENSEN, J. K.; SORENSEN, S.O.; HARHOLT, J.; GESHI, N. Biosynthesis of pectin. **Physiologia Plantarum**, v. 129, p. 283-295, 2007.

SEIDERMAN, J. Selected fruits from middle and South America. **Fruit Processing**, v. 7, p. 304-311, 2002.

SILA, D. N.; SMOUT, C.; SATARA, Y.; TRUONG, V.; LOEY, A. V.; HENDRICKX, M. Combined thermal and high-pressure effect on carrot pectinmethylesterase stability and catalytic activity. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n.3, p. 755-764, fev. 2007.

SILVA, S. **Frutas Brasil Frutas**. São Paulo: Empresa das Artes, Projetos e Edições Artísticas Ltda. 1993.

SILVA, R. **Efeito da liofilização sobre a estrutura e atividade enzimática da L-asparaginase de *Escherichia coli***. São Paulo, 2002. 88 p. Dissertação (Mestre em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo – (USP). Disponível em <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134/tde-13092006-115358/pt-br.php>>. Acesso em: 30 jun. 2012.

SILVA, T. V.; RESENDE, E. D.; VIANA, A. P.; ROSA, R. C. C.; PEREIRA, S. M. F.; CARLOS, L. A.; VITORAZI, L. Influência dos estádios de maturação na qualidade do suco do maracujá-amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 27, n. 3, p. 472-475, Dez 2005.

SILVA, T. V.; LIMA, R. V.; AZEVEDO, I. G.; ROSA, R. C. C.; SOUZA, M. S.; JURANDI OLIVEIRA, J. G. Determinação da maturidade fisiológica de frutos de maracujazeiro-amarelo colhidos na região norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – São Paulo, v. 32, n. 1, p. 057-066, Mar 2010.

ŞİMŞEK, Ş. **Production of Commercially Suitable Pectin methylesterase and Polyphenol oxidase from Agro-industrial Wastes**. 2004. Dissertação, (Mestre em Ciências), İzmir Institute of Technology. Turkey, 2004, 94f. Disponível em <library.iyte.edu.tr/tezler/master/.../t000508.doc>. Acesso em: 8 out. 2012.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8^a ed. Pioneira Thomson Learning, São Paulo, 2006.

SOARES, M. M. C. N.; SILVA, R.; GOMES, E. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 299-303, out./dez. 1999.

TAVARES, J. T. Q.; SILVA, C. L.; CARVALHO, L. A.; SILVA, M. A.; SANTOS, C. M. G. TEIXEIRA, L. J.; SANTANA, R. S. Aplicação pós-colheita de cloreto de cálcio em maracujá-amarelo. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 15, n. 1, p. 7-12, jan./jun. 2003.

TAVARES, S. A.; PEREIRA, J.; GUERREIRO, M. C.; PIMENTA, C. J.; PEREIRA, L.; MISSAGIA, S. V. Caracterização físico-química da mucilagem de inhame liofilizada. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 5, p. 973 -979, set./out., 2011.

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K.; HANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 01, p. 47-73. 1997.

THÉ, P. M. P.; CARVALHO, V. D.; ABREU, C. M. P.; NUNES, R. P.; PINTO, N. A. V.; Modificações na atividade enzimática em abacaxi 'Smooth Cayenne' em função da temperatura de armazenamento e do estágio de maturação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 2, p. 364-370, mar./abr. 2001.

THIBAUT, J. F.; PETIT, R. Les substances pectiques: généralités et domaine d'application dans les industries alimentaires. **Industries alimentaires et agricoles**, v. 96, n. 12, dez. 1979.

TUCKER, G. A. Introduction. In: SEYMOUR, G. B.; TAYLOR, J. E.; TUCKER, G. A. **Biochemistry of Fruit Ripening**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 1-51. 145

ÜNAL, M. Ü.; BELLUR, E. Extraction and characterisation of pectin methylesterase from black carrot (*Daucus carota* L.). **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 836–840, out. 2009.

VERAS, M. C. M.; PINTO, A. C. Q.; MENESES, J. B. Influência da época de produção e dos estádios de maturação nos maracujá-doce e ácido nas condições de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35. n. 5. p. 959-966, 2000.

VERSTEEG, C.; ROMBOUTS, F.; PILNIK, W. Purification and some characteristics of two pectinesterase isoenzymes from orange. **Lebensm Wiss Technology**, v. 11, p. 267-274, 2000.

VILAS BOAS, E.V.; B.; CHITARRA, A.B.; CHITARRA, M.I.F. Modificações pós-colheita de banana 'Prata' gama irradiada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília - DF, v.31, n.9, p.599-607, 1996.

VINCKEN, J. P., SCHOLS, H. A.; OOMEN, R. J. F. J.; MCCANN, M. C.; ULVSKOV, P., VORAGEN, A. G. J.; VISSER, R. G. S. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. **Plant Physiology**, v. 132, n. 4, p. 1781-1789, ago. 2003.

VIVAR-VERA, M. A.; SALAZAR-MONTOYA, J. A.; CALVA-CALVA, G.; RAMOS-RAMÍREZ, E. G. Extraction, thermal stability and kinetic behavior of pectinmethylesterase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit. **LWT**, v. 40, p. 278–284, 2007.

VORAGEN, A. G. J.; COENEN, G.- J.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 263–275, 2009.

VRIES, R. P.; JANSEN, J.; AFUILAR, G.; PARENICOVÁ, L.; JOOSTEN, V.; WÜLFERT, F.; BENEN, J. A.; VISSER, J. Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 530, n. 1, p. 41-47, 2002.

WICKER, L.; VASSALLO, M. R.; ECHEVERRIA, E. J. Solubilization of cell wall bound. Thermostable pectinesterase from Valencia Orange. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 1171-1174, 1988.

WON, N. H.; WALKER, B. L. A study on the extraction of thermostable pectinesterase from Valencia orange. **Korean Journal of Food Science and Technology**, v. 27, p. 658-665, 1995.

YADAV. S.; YADAV, P. K.; YADAV, D.; YADAV, K. D. S. Pectin lyase: a review. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1-19, 2009.

ANEXOS

ANEXO A - Tabela de Precipitação com Sulfato de Amônio

		Final percent saturation to be obtained																	
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
Starting percent saturation		Amount of ammonium sulphate to add (grams) per liter of solution at 20 °C																	
0		113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761	
5		85	115	146	179	212	246	282	319	358	397	439	481	526	572	621	671	723	
10		57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685	
15		28	58	88	119	151	185	219	255	293	331	371	413	456	501	548	596	647	
20		0	29	59	89	121	154	188	223	260	296	337	378	421	465	511	559	609	
25			0	29	60	91	123	157	191	228	265	304	344	386	429	475	522	571	
30				0	30	61	92	125	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533	
35					0	30	62	94	126	163	199	236	275	316	358	402	447	495	
40						0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457	
45							0	31	64	98	132	169	206	245	286	329	373	419	
50								0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381	
55									0	33	66	101	138	175	215	256	298	343	
60										0	33	67	103	140	179	219	261	305	
65											0	34	69	105	143	183	224	267	
70												0	34	70	107	146	188	229	
75													0	35	72	110	149	190	
80														0	36	73	112	152	
85															0	37	75	114	
90																0	37	76	
95																	0	38	

ANEXO B - Técnica Bradford

MÉTODO DE BRADFORD (1976)

Utilizado para quantificação de proteínas totais

1) Reagentes:

- ♣ Comassie Blue G-250, H_3PO_4 e etanol;
- ♣ Soro Albumina Bovina (BSA) (1mg/mL ou 10 µg/0,1mL).

2) Metodologia

- ♣ Preparação do reagente Comassie-blue G-250

Dissolver 100 mg de Comassie blue em 50 mL de etanol 95%. Adicionar 100 mL de H_3PO_4 85% e completar para 1 L. Deixar overnight com agitação constante e filtrar. Dessa forma, as concentrações finais serão: 0,01% de Comassie, 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol. (Ácido fosfórico deve ser adicionado ao Comassie dissolvido em etanol e nunca o contrário).

- ♣ Procedimento para obtenção da curva padrão

Proceder conforme Tabela 1. Após, agitar os tubos em vórtex e fazer a leitura no espectrofotômetro U.V. em $\lambda = 595$ nm.

Tabela 1. Procedimento para obtenção da curva padrão de proteínas utilizando-se como padrão BSA (1 mg/mL).

Tubos	BSA (1 mg / mL) (mL)	Água (mL)	Comassie Blue G-250 (mL)	µg proteína
1	0,00	0,10	5,0	0
2	0,02	0,08	5,0	20
3	0,04	0,06	5,0	40
4	0,06	0,04	5,0	60
5	0,08	0,02	5,0	80
6	0,10	0,00	5,0	100

* Volume reacional = 5,1 mL