

**INATIVAÇÃO TÉRMICA E QUÍMICA DA POLIGALACTURONASE DA  
CASCA DO MARACUJÁ VISANDO À PRESERVAÇÃO DA PECTINA**

**PATRÍCIA RODRIGUES FERREIRA**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE**

**DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2015**

# INATIVAÇÃO TÉRMICA E QUÍMICA DA POLIGALACTURONASE DA CASCA DO MARACUJÁ VISANDO À PRESERVAÇÃO DA PECTINA

**PATRÍCIA RODRIGUES FERREIRA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Eder Dutra de Resende  
Co-orientadora: Meire Lelis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2015

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 195/2015

Ferreira, Patrícia Rodrigues

Inativação térmica e química da poligalacturonase da casca do maracujá visando à preservação da pectina / Patrícia Rodrigues Ferreira. – 2015.

50 f. : il.

Orientador: Eder Dutra de Resende

Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2015.

Bibliografia: f. 44 – 50.

1. Pectinase 2. Tratamento térmico 3. CaCl<sub>2</sub> 4. pH I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD–  
664.80456

# INATIVAÇÃO TÉRMICA E QUÍMICA DA POLIGALACTURONASE DA CASCA DO MARACUJÁ VISANDO À PRESERVAÇÃO DA PECTINA

**PATRÍCIA RODRIGUES FERREIRA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2015

Comissão Examinadora

---

Prof<sup>a</sup> Meire Lelis Leal Martins (Ph.D., Molecular Biology And Biotechnology) – UENF

---

Prof. Rogério Figueiredo Daher (D.Sc.,Produção Vegetal) – UENF

---

Prof<sup>a</sup> Caroline Mellinger Silva (D.Sc.,Bioquímica) – EMBRAPA

---

Prof. Eder Dutra de Resende (D.Sc., Engenharia Química) – UENF  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua presença, luz e força, sempre me abençoando e capacitando para tudo aquilo que Ele me destina

Aos meus pais Márcio e Floripes, e ao meu irmão Jean, que mesmo distantes, estiveram sempre comigo, ensinando-me, apoiando-me, amando-me incondicionalmente e acreditando em meu potencial. Eu amo vocês!

Ao meu orientador Eder e à minha coorientadora Meire pelo apoio e sugestões pertinentes e valiosas durante a construção desse trabalho;

Ao professor Rogério, por toda a ajuda na estatística e por participar da banca de mestrado, contribuindo com importantes e enriquecedoras sugestões;

À Silvia, o meu agradecimento carinhoso por participar de minha banca do projeto de mestrado, contribuindo com valiosas sugestões;

À Caroline, obrigada por participar de minha banca de mestrado e por toda a ajuda oferecida por ela e pela EMBRAPA-Agroindústria de alimentos;

À técnica Ana, pelo apoio fornecido durante os experimentos e a amizade;

Agradeço a todos meus amigos que fazem parte da família LTA, tornando esse momento em minha vida muito especial. Agradeço em especial às amigas, Simone e Suellen, que sempre me ouviram, me auxiliaram e me cederam a mão amiga nos dias em que a luz não brilhava tanto;

À FAPERJ, pela bolsa de estudos concedida;

Agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e ao Laboratório de Tecnologias em Alimentos pela oportunidade de realização deste curso.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	VIII
ABSTRACT .....	X
1.INTRODUÇÃO .....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Características do maracujá e alternativas para o aproveitamento de resíduos .....	3
2.2. Impactos na saúde: Ingestão da farinha de maracujá .....	6
2.3. Pectina: Importância na estrutura da parede celular .....	7
2.4. Pectinases: Enzimas de importância na indústria de alimentos.....	10
2.4.1. Poligalacturonase (PG) .....	10
2.4.2. Pectinametilesterase (PME) .....	11
2.5. Inativação enzimática .....	11
2.5.1. Efeitos do Ca <sup>2+</sup> .....	12
2.5.2. Tratamento térmico .....	12
2.5.3. Alteração do pH.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Experimento I: Tratamento térmico visando à inativação da PG presente no albedo homogeneizado .....	16
3.1.1. Matéria-prima .....	16

3.1.2. Processo de homogeneização da casca bruta dos frutos .....	16
3.1.3. Tratamento térmico .....	18
3.1.4. Determinação da atividade da enzima PG .....	20
3.1.5. Delineamento experimental .....	20
3.1.6. Efeito da temperatura na inativação da PG em extrato enzimático do albedo.....	20
3.2. Experimento II: Influência da alteração do pH do albedo homogeneizado visando à inativação de PG .....	21
3.2.1. Matéria-prima .....	21
3.2.2. Tratamento com alteração do pH da casca bruta homogeneizada .....	21
3.2.3. Delineamento experimental .....	22
3.3. Experimento III: Determinação das condições de tratamento com Ca <sup>2+</sup> visando à inativação enzimática da PG presente no albedo homogeneizado ...	23
3.3.1. Matéria-prima .....	23
3.3.2. Tratamentos com Ca <sup>2+</sup> .....	23
3.3.3. Delineamento experimental .....	23
3.4. Experimento IV: Grau de esterificação da pectina extraído do albedo homogeneizado e tratado com diferentes concentrações de Ca <sup>2+</sup> .....	24
3.4.1. Tratamento e processamento do albedo para a fabricação da farinha do maracujá .....	24
3.4.2. Extração das substâncias pécticas.....	25
3.4.3. Avaliação do grau de esterificação das pectinas obtidas da farinha do albedo.....	25
3.4.4. Delineamento experimental .....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
4.1. Caracterização da matéria-prima utilizada nos experimentos.....	28
4.2. . Experimento I: Tratamento térmico visando à inativação da PG presente no albedo homogeneizado.....	28
4.2.1. Efeitos do binômio temperatura/tempo na inativação da PG em extrato enzimático obtido do albedo .....	29
4.2.2. Tratamento térmico do homogeneizado da casca bruta de maracujá ..	30
4.3. Experimento II: Influência da alteração do pH do albedo homogeneizado visando à inativação de PG .....	35
4.4. Experimento III: Determinação das condições de tratamento com Ca <sup>2+</sup> visando à inativação enzimática da PG presente no albedo homogeneizado ...	36
4.5. Experimento IV: Grau de esterificação da pectina extraído do albedo homogeneizado e tratado com diferentes concentrações de Ca <sup>2+</sup> .....	39
CONCLUSÕES .....	42



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
---------------------------------	----

## RESUMO

**PEREIRA**, Patrícia Rodrigues; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2015; Inativação térmica e química da poligalacturonase da casca do maracujá visando à preservação da pectina; Orientador: Prof. Eder Dutra de Resende.

A poligalacturonase (PG) é uma enzima que atua clivando as ligações endo- e exo- $\alpha$ - (1- 4) dos ácidos galacturônicos, levando a despolimerização das substâncias pécticas da maioria dos frutos. O presente trabalho consistiu em estudar a eficiência de tratamento térmico e químico com o objetivo de bloquear a ação da PG, preservando as características químicas da pectina presente na farinha do albedo. Os frutos foram colhidos no estágio de maturação verde-claro e após desinfecção e remoção da polpa, as cascas foram cortadas em pequenos pedaços para facilitar a homogeneização e imediatamente processadas em aparelho liquidificador adaptado com tela de 1,5 mm para evitar a presença de partículas grandes que agregam o material do epicarpo. O material proveniente da homogeneização da casca bruta foi imediatamente prensado em malha de tecido sintético, para remoção do excesso de água e, em seguida, aplicados os seguintes tratamentos: tampões com pH variando de 4 a 10; soluções de  $\text{Ca}^{2+}$  a 0,01 e 1% ou tratamento térmico a 90°C por 4 horas. A concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  a 1% na solução de suspensão do material homogeneizado do albedo do maracujá

influenciou significativamente na inativação da enzima PG e na redução do conteúdo de ácidos carboxílicos livres (ACL) da pectina. O tratamento térmico diretamente no albedo homogeneizado, mantido em suspensão, reduziu a atividade enzimática de PG, em 50%. Já na inativação em extrato bruto, obteve-se inativação da enzima após incubação nas temperaturas de 65, 75 e 85°C por 30, 20 e 10 minutos, respectivamente. Com relação ao tratamento de mudança do pH do albedo homogeneizado, houve uma ligeira redução da atividade enzimática da PG quando se comparou o tratamento controle (pH 6 sem adição de tampão) e o tratamento em pH 6 (tampão fosfato de sódio), sugerindo que os grupos carboxílicos livres do ácido galacturônico tenham sido parcialmente neutralizados por íons sódio, potássio, entre outros presentes no tampão, diminuindo os sítios para atuação da PG. Para futuras pesquisas, sugere-se uma determinação minuciosa das modificações dos componentes celulares do albedo tratado com  $\text{Ca}^{2+}$ , podendo assim comprovar o benefício de se tratar o albedo, para obtenção de uma pectina de qualidade reológica elevada, favorecendo o custo/benefício no balanço final para obtenção de uma farinha de maracujá padronizada que visa assegurar aos clientes um produto de melhor qualidade.

## ABSTRACT

In one step of the albedo peel process and purification to obtain a quality flour, promotes the trituration of crude peel in water, leading to rupture of the mesocarp tissue and facilitating the contact between the cell wall components and the enzymes that promote hydrolysis of pectin. The polygalacturonase (PG) is considered a key enzyme in the depolymerisation of most fruit. It acts by cleaving the linked endo- and exo-  $\alpha$ - (1-4) of the galacturonic acids leading to decrease in size and molecular weight of pectins. Typically, the enzyme inactivation is achieved by heat treatment promoting the denaturation of enzymes or immersion in  $\text{Ca}^{2+}$  salts since their ions bind to pectins, obstructing the access of the enzyme to the substrate. Further, studies show that the pH can also regulate the catalytic activity of cell wall enzymes. Therefore, this study presents the best treatment to preserve the quality of the extracted pectin albedo flour. The fruits were harvested at the stage of bright green maturation and after disinfection and removal of the pulp; the peels were cut into small pieces to facilitate the homogenization and immediately processed in blender machine fitted with 1.5 mm screen to avoid the presence of large particles that add the epicarp material. The homogenization of the material from crude peel was immediately pressed into mesh synthetic fabric to remove the water excess and then applied the following treatments: buffers with pH ranging from 4 to 10;  $\text{Ca}^{2+}$  solution to 1% and 0.01 to heat treatment at 90 ° C

for 4 hours. It follows that the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  of 1% homogenate in the suspension solution of passion fruit mesocarp significantly influence the blocking of the enzyme and PG in reducing the content of free carboxylic acid (ACL) from pectin. The heat treatment directly on the mesocarp homogenate was not able to inactivate the enzyme PG at  $90^{\circ}\text{C}$  for 4 hours. Since inactivation of crude extract was obtained successfully in inactivation of the enzyme after incubation at 65, 75 and  $8^{\circ}\text{C}$  for 30, 20 and 10 minutes, respectively. Regarding to the treatment changing pH of the homogenised mesocarp was observed that the simple fact of adding a buffer, regardless of pH, was enough to reduce the enzyme activity levels. For future researches, it is suggested that a thorough determination of the changes of the cellular components of the treaty mesocarp with  $\text{Ca}^{2+}$ , thus being able to prove the benefit to be treating the flesh, to obtain a high rheological behavior of pectin, favoring the cost / benefit balance, to obtain a standardized passion fruit flour which aims to provide customers with a better product quality

## 1. INTRODUÇÃO

A elevada produção de maracujá, no país de aproximadamente 923 mil toneladas em 2012 (IBRAF, 2013) e o elevado índice de industrialização (cerca de 50% do total) da variedade flavicarpa, reforçam a necessidade de estudos relativos ao aproveitamento dos resíduos agroindustriais.

Desta forma, a elaboração de novos produtos com maior valor agregado pode ser uma alternativa tecnológica viável para minimização de tal perda econômica. O aproveitamento desses resíduos proporcionaria mais uma opção de renda para as indústrias, aumentando a lucratividade e representando uma alternativa para solucionar a problemática das cascas, que comumente são descartadas e são fontes poluidoras do meio ambiente.

A casca do maracujá pode ser utilizada para a formulação de produtos ricos em fibras, como a farinha da casca que contribui para uma alimentação saudável, e ainda, pode ser uma fonte de pectina para uso industrial.

No setor industrial, a pectina é usada para aumento de viscosidade, estabilizante e agente geleificante em alimentos e bebidas, com aplicação em doces, geleias e sucos de frutas concentrados.

Oliveira (2009) observou que a remoção do epicarpo do maracujá permite a obtenção do albedo puro, que apresenta uma tonalidade branca e proporciona a fabricação de uma farinha clara após a secagem. Já a fabricação da farinha

utilizando a casca bruta gera um produto de coloração mais escura, devido às diferentes tonalidades esverdeadas e amareladas da superfície da casca, além das impurezas e contaminações naturais aderidas no epicarpo da casca. Contudo, a remoção do epicarpo que reveste a casca do maracujá é um procedimento difícil e demorado para aplicações industriais, pois ele fica ligado ao albedo, podendo ser removido por operações manuais com o uso de facas ou lâminas descascadoras.

Pesquisas realizadas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) geraram resultados inovadores para o processamento da casca do maracujá, desenvolvendo um equipamento de separação do albedo e epicarpo para produção de farinha e extração da pectina. Porém, a etapa inicial de processamento da casca para purificação do albedo consiste na homogeneização da casca bruta. Contudo, esse processo de trituração da casca bruta promove o rompimento do tecido do albedo e facilita o contato entre as substâncias pécticas que compõem a parede celular e as enzimas presentes nas células e que hidrolisam esse material constituinte da parede celular.

A poligalacturonase (PG) é considerada enzima chave na despolimerização das substâncias pécticas da maioria dos frutos. Ela atua clivando as ligações endo- e exo- $\alpha$ -(1-4) dos ácidos galacturônicos, afetando negativamente o grau de esterificação da pectina. Normalmente, a inativação de enzimas é conseguida através de tratamento térmico, promovendo a desnaturação das enzimas ou imersão em  $\text{CaCl}_2$ , visto que os seus íons se ligam às pectinas, dificultando o acesso das enzimas ao substrato. Estudos demonstram que o pH pode também regular a atividade catalítica de enzimas da parede celular. Desta forma, a inativação da enzima PG representa uma etapa importante para a manutenção da qualidade original da pectina presente na massa de albedo. Isto adquire importância ainda mais relevante quando se considera o grande volume de maracujás processados diariamente nas agroindústrias de sucos.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo estudar a eficiência de tratamento térmico, tratamento de alteração do pH e tratamento com  $\text{CaCl}_2$ , com o intuito de impedir a ação da PG, preservando as características químicas da pectina presente na farinha do albedo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Características do maracujá e alternativas para o aproveitamento dos resíduos

Na linguagem tupi, maracujá significa “alimento em forma de cuia”, é um fruto originário das regiões tropicais da América do Sul, tendo mais de 150 espécies nativas do Brasil. A espécie *Passiflora edulis f. flavicarpa* (maracujá-amarelo) é a mais cultivada no Brasil (Souza e Lorenzi, 2005). Taxonomicamente, a espécie *edulis* pode ser indicada com uso do nome *Passiflora edulis* Sims para qualquer cor de fruto ou planta de maracujá azedo, evitando incoerências taxonômicas inerentes às particularidades entre espécies e cultivares (Bernacci et al., 2008).

O maracujá é classificado botanicamente como fruto carnoso, do tipo baga, que apresenta sementes com arilo carnoso. É um fruto constituído de epicarpo ou exocarpo (casca superficial), albedo (parte branca) e endocarpo (polpa com semente e o arilo carnoso) conforme destacado na Figura 1.

A maior relevância econômica dos frutos do maracujazeiro vem do produto industrializado sob a forma de suco integral ou concentrado, devido às suas características sensoriais e também aos seus aspectos nutritivos. Entretanto, há possibilidade de aproveitamento dos resíduos industriais, principalmente a partir da semente e das cascas (Castro e Kluge, 1998).



Com o desenvolvimento da maturação do maracujá-amarelo, ocorre a diminuição da proteína bruta, açúcar redutor, pectina total e cinzas presentes na casca. Já a composição mineral da casca não é influenciada pelo avanço da maturação, sendo os minerais, cálcio e ferro, os mais encontrados, reforçando o potencial da casca do maracujá como complemento para novos produtos alimentícios (Reolon et al., 2008).

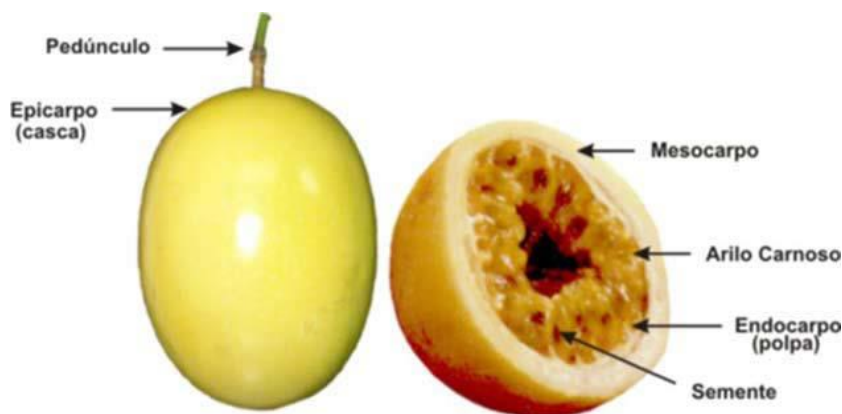


Figura 1. Partes constituintes do maracujá amarelo (*Passiflora edulis*).  
Fonte: Ministério da Integração Nacional, 2004.

Os aspectos toxicológicos do maracujá têm sido estudados principalmente quanto à presença de glicosídeos cianogênicos. Matsuura (2005) constatou a presença destes compostos no albedo de maracujá amarelo, sugerindo a eliminação dessas substâncias por cozimento em água em ebulição.

Canteri et al. (2010), ao analisarem as pectinas extraídas de diferentes frações do maracujá, tiveram um maior rendimento de pectina a partir do albedo. A composição média foi de 3,1% de proteínas; 0,6% de lipídeos; 7,1% de cinzas; 66,1% de fibra dietética total; 0,13% de compostos fenólicos, 23% de carboidratos disponíveis, 6,10% de umidade e valor calórico de 242 Kcal por 100 g de produto.

A pectina extraída do albedo a 80° C por 20 minutos com 50 mM de ácido nítrico, numa razão de 1: 50 (p/v) apresentou alto grau de esterificação (79%) e de metoxilação (82%). Assim, para obtenção da pectina com menor quantidade de compostos não pécnicos e melhor viscosidade, o albedo deve ser utilizado.

Na busca de um melhor rendimento de extração de pectina a partir do albedo, Peres e Canteri (2005) obtiveram 15,7% de rendimento usando uma razão soluto/solvente de 1: 50 e temperatura de 80° C durante a extração.

D'Addosio et al. (2005), analisaram a influência do estado de maturação da casca e do ácido, utilizado na extração de pectina da casca seca de maracujá-amarelo, em condições fixas de pH, temperatura e tempo de extração única. Obtiveram o rendimento de 18,45%, e a casca no estado maduro apresentou o maior conteúdo de pectina.

Yapo e Koffi (2006) realizaram a extração de pectina da casca de maracujá-amarelo, resultando em pectinas ricas em ácido galacturônico com baixo grau de esterificação e conteúdos relativamente baixos de açúcares neutros e grupos acetila. As características de aplicação dessa pectina foram similares às pectinas cítricas de baixa metoxilação.

A farinha do albedo de maracujá pode ser usada como ingrediente para fabricação de bolos, doces e demais produtos. Por exemplo, Matsuura (2005) elaborou barras de cereais com albedo de maracujá como ingrediente, com acréscimo do teor de pectina no produto final (0,88 a 1,26 %), o que resultou em um produto de boa consistência, sabor e cor, de acordo com a análise sensorial aplicada.

A pectina extraída da casca do maracujá foi usada como agente estabilizante em um sorvete com teor reduzido de gordura. Os resultados da análise mostraram que o emprego da pectina em conjunto à redução no teor de gordura, proporcionou um sorvete com melhor aeração, aumento da viscosidade e melhor estabilidade ao derretimento (Barboza et al., 2012).

A pectina apresenta-se como uma alternativa importante, com agregação de valor e solução parcial para o tratamento e para a disposição final no processo global do gerenciamento de resíduos sólidos, pela minimização do volume a ser descartado, entre 40-70% do total, variável conforme a fruta de origem. Há uma tendência crescente das indústrias em buscar alternativas que promovam o fechamento da "reciclagem" de um resíduo, com o máximo de aproveitamento possível e por meio da maior exploração comercial possível dos componentes antes considerados como subprodutos (Kertes, 1951).

## 2.2. Impactos na saúde: Ingestão da farinha do maracujá

Nos últimos anos, a casca do maracujá tem sido estudada por ser rica em pectina, gerando efeitos benéficos para o organismo quando ingerida periodicamente. Isso ocorre porque as substâncias pécticas são componentes solúveis altamente viscosos e fermentáveis com capacidade de reter água. A elevada hidratabilidade e a propriedade de formar gel ocasionam aumento da viscosidade do conteúdo no intestino e retardo da absorção dos nutrientes para a corrente sanguínea (Roehring, 1988; Schneeman, 1986; Corrêa, 2005).

Matsuura (2005) identificou que albedo *in natura* de maracujá apresenta pH em torno de 4,4, 90,8% de umidade, baixo teor de sólidos solúveis (4,7°Brix) e baixa acidez (0,31%, expresso em ácido cítrico). De acordo com a composição centesimal apresentada na Tabela 1, pode-se observar quantidades consideráveis de proteínas (6,8%) e minerais, como potássio (331,7 mg/100g) e Cálcio (189,8 mg/100g). É observado um alto teor de fibras solúveis e insolúveis, o que viabiliza a utilização da casca como farinha ou em outros produtos indicados para as pessoas que necessitam aumentar o consumo de fibras.

Tabela 1. Composição centesimal do albedo de maracujá-amarelo (em base seca).

Constituintes	
Proteínas (%)	6,8
Lipídios (%)	1,3
Carboidratos (%)	84,2
Fibras (%)	
Total	67,5
Insolúveis	35,8
Celulose	30,7
Hemicelulose	1,6
Lignina	1,1
Solúveis	31,7
Substâncias pécticas	27,8
Cinzas (%)	7,7
Cálcio (mg/100g)	189,8
Potássio (mg/100g)	331,7
Ferro (mg/100g)	6,3
Sódio (mg/100g)	248,2

Fonte: Adaptado de Matsuura, 2005

Já foi relatado, por exemplo, que a farinha da casca de maracujá possui importante efeito no metabolismo do colesterol, reduzindo os níveis sanguíneos

de colesterol total e da fração LDL-colesterol quando se há um consumo regular da farinha (Corrêa, 2005). Derivi e Mendez (1982) verificaram que a adição de pectina cítrica à ração hipercolesterolemizante (0,6% de colesterol) reduziu os níveis de colesterol sérico em coelhos. Nishina et al. (1991) demonstraram que ratos alimentados com dieta acrescida da farinha de maracujá durante quatro semanas apresentaram significativa redução dos níveis de colesterol total, HDL-colesterol e dos níveis de triacilgliceróis, em relação ao grupo controle. Esses múltiplos efeitos não foram observados nos grupos recebendo farelo de aveia, farelo de trigo ou celulose.

Medeiros et al. (2009) avaliaram a toxicidade clínica do uso da farinha de albedo em 36 voluntários saudáveis, que ingeriram 10 gramas do produto 3 vezes ao dia, durante 8 semanas. Logo após, foram realizados exames que não evidenciaram sinais de toxicidade nos avaliados, indicando que a farinha do albedo poderia ser usada em novos estudos para sua implementação na alimentação humana.

### 2.3. Pectina: Importância sobre a estrutura da parede celular de frutos

A parede celular está relacionada com os processos de crescimento, desenvolvimento, manutenção e reprodução vegetal, sendo responsável pela: resistência mecânica das estruturas vegetais, promoção da junção das células e proteção contra agressões físicas e químicas (Raven et al., 1996). A presença da parede celular é uma característica intrínseca das células vegetais. Os principais componentes da parede celular são celulose, hemiceluloses, lignina e pectina.

As hemiceluloses referem-se a um grupo heterogêneo de polímeros de hexoses, pentoses e ácidos urônicos (Damodaran et al., 2010). Já a lignina é um polímero tridimensional composto de unidades de fenil propano, como vanilina e siringaldeído, os quais estão ligados por meios de cadeias alifáticas laterais de três carbonos. A parede celular também apresenta pequenas quantidades de proteínas estruturais e enzimas.

A celulose é o carboidrato mais abundante da biosfera, estando presente em até 40% da matéria seca de todas as plantas superiores. É insolúvel em água e constituído por cadeias lineares que contém três a cinco mil resíduos de D-

glucose unidos por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), que constitui o arcabouço esquelético que dá suporte às outras moléculas da parede celular primária (Paiva et al., 2009).

As estruturas das moléculas de pectina apresentam uma cadeia linear formada por unidades de ácido D- galacturônico, unidos por ligações  $\alpha$ -(1,4). As pectinas presentes na parede celular primária apresentam as cadeias de ramnogalaturonana ramificadas com cadeias longas de arabinose e galactose. Já na lamela média, as cadeias de ramnogalaturonana apresentam-se ligeiramente ramificadas, com cadeias curtas de arabinose e galactose (Damodaran et al., 2010).

As substâncias pécticas podem ser deterioradas através de 3 tipos de reação, conforme esquematizado na Figura 2. A primeira é a reação de um número de grupamentos metoxilas, dando origem aos ácidos pécticos (Wong,1995). Já em meio ácido, as ligações glicosídicas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) são hidrolisadas e ocorre desmetoxilação da pectina. Em meio alcalino pode ocorrer reações de  $\beta$ -eliminação, em que o hidrogênio em C5, mais ácido em função do grupo éster metílico é atacado pelo íon hidróxido, resultando na transferência eletrônica e levando a formação entre C4 E C5 de uma dupla ligação conjugada com aquela da função carboxila (Canteri et al., 2012; Wong,1995).

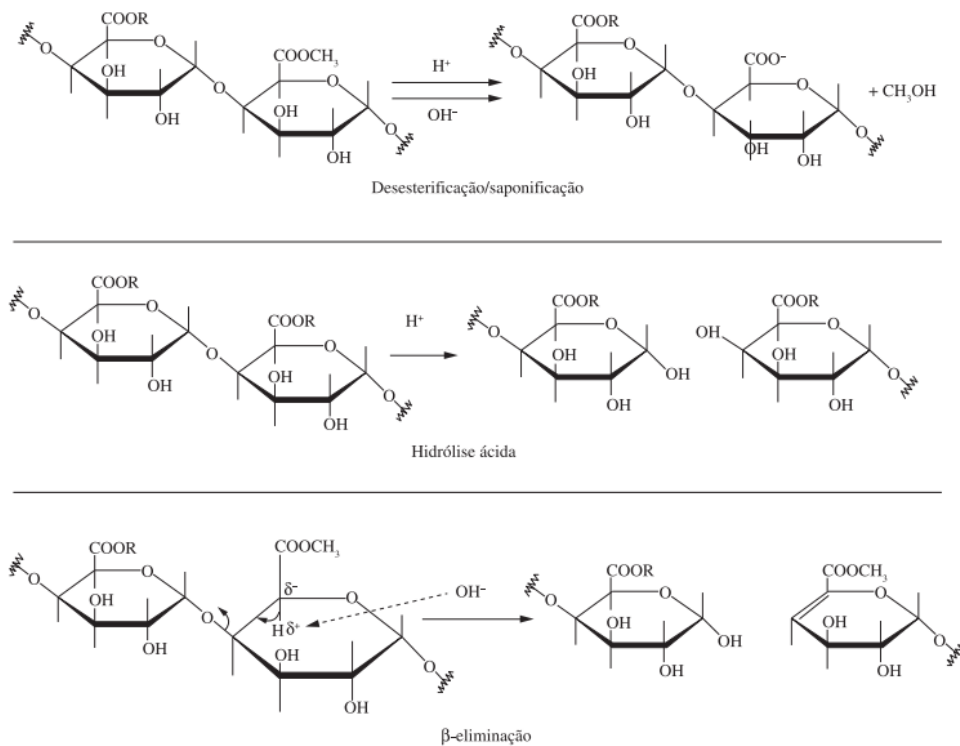


Figura 2. Principais reações de degradação das substâncias pécticas.

Fonte: Canteri et al.,2012.

Pode ainda ocorrer degradação desencadeada por enzimas produzidas pelo vegetal ou por microrganismos. A pectinametilesterase (PME) leva a desmetilação preliminar, seguida da hidrólise ácida das ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) pelas poligalacturonases (PG). As pectinas liases e pectato liases de origem microbiana, podem despolimerizar as pectinas por reações também de  $\beta$ -eliminação (Canteri et al., 2012). A hidrólise da pectina por enzimas deve ser evitada já que reduz a adesão intercelular levando ao amolecimento do tecido (Damodaran et al., 2010).

A pectina deve ser constituída de, ao menos, 65% de ácido galacturônico, segundo a FAO e EU (União Européia) (Willats et al., 2006). As pectinas podem ser encontradas na forma de pó, de coloração branca, amarela clara, acinzentada ou levemente escurecida (Canteri et al., 2010).

Normalmente as pectinas têm uma parte dos grupos carboxilas da cadeia principal de ácido galacturônico esterificada com grupos metila. Essa substituição é expressa como grau de metilação (DM) ou grau de esterificação (DE). O DM é o percentual do total de resíduos de ácido galacturônico esterificado apenas com grupo metoxila, enquanto o DE, à razão dos grupamentos esterificados de ácido D-galacturônico pelo total de grupamentos de ácido galacturônico. O DE pode incluir os grupos acetila (Canteri et al., 2012).

A solubilidade é outro parâmetro fortemente influenciado pelas propriedades físico-químicas da pectina, de modo que a solubilidade tende a aumentar com o incremento do grau de metoxilação e com a redução do peso molecular da pectina. Estas características direcionam aplicações industriais e tecnológicas diferenciadas (Pomeranz e Meloan, 2000).

As propriedades físicas das moléculas de pectina as tornam um ingrediente importante e bastante utilizado pela indústria alimentícia para aumentar a viscosidade de soluções, e principalmente assumindo papel de hidrocoloide na função de dispersante e estabilizante de diversas emulsões de carboidratos e de proteínas em formulações e alimentos naturais, e na produção de geleias, que incrementa via de regra, valor agregado e tecnológico aos frutos (Paiva et al., 2009).

## 2.4. Pectinases: Enzimas de importância na indústria de alimentos

Pectinases é um nome coletivo para a família de enzimas pectínicas que catalisam o processo de degradação das paredes celulósicas das células do fruto, acelerando sua decomposição. Este processo deve-se principalmente à ação das enzimas que despolimerizam a pectina, como exemplo a Poligalacturonase (PG) e pectinametilesterase (PME) (Vilas Boas, 2010).

As tecnologias tradicionais (processamento térmico), bem como as novas tecnologias (tais como o tratamento de alta pressão, processamento através de impulsos de campo elétrico) desempenham um papel importante em influenciar as reações de conversão enzimática de pectina. Durante o processamento, pectinases podem ser parcial ou totalmente inativadas, resultando, por exemplo, em uma pectina de melhor qualidade. E ainda, ações de conversão de pectina não enzimática (química) que dificilmente ocorrem em condições ambientais, podem ser induzidas ou melhoradas. A magnitude e a direção das alterações induzidas pelo tratamento na enzima podem impactar positivamente ou negativamente, dependendo das características desejadas do produto final (Buggenhout et al., 2009).

### 2.4.1. Poligalacturonase (PG)

A PG é considerada enzima chave na despolimerização das substâncias pectínicas da maioria dos frutos. Ela atua clivando as ligações endo- e exo- $\alpha$ - (1 $\rightarrow$ 4) dos ácidos galacturônicos, e sua atividade aumenta significativamente durante o amadurecimento resultando rompimento das barreiras intercelulares (Parkin, 2010).

Em alguns frutos, ela pode ser encontrada em diferentes isoformas: as endo-poligalacturonases, atuando com mecanismo de hidrólise ao acaso, e as exopoligalacturonases, que têm mecanismo de hidrólise nas extremidades da cadeia (terminal). A maioria das PGs encontradas são enzimas de ação endo (Duvetter et al., 2009).

Pressey e Avants (1973a), ao estudarem o amolecimento de pêssegos, identificaram que a PG está extremamente associada à conversão de protopectina em formas solúveis. A PG não foi encontrada em pêssegos verdes,

contudo, a atividade apareceu na medida em que a fruta começou a amolecer e aumentou acentuadamente conforme ocorria o amadurecimento.

A enzima PG tem se mostrado resistente ao tratamento térmico. Wakabayashi e Huber (2001) estudaram as diferentes isoformas da PG em abacate, sendo que a isoforma termoestável teve uma perda da atividade em 80%, após tratamento térmico a 65°C por 5 minutos, e a isoforma termolábel teve uma perda de 90% nas mesmas condições de tempo e temperatura. Singh e Dwivedi (2008) obtiveram 100% de inativação da PG purificada de mangas, após tratamento térmico à temperatura de 70°C por 5 minutos. Já Pressey e Avants (1973b) inativaram a PG purificada a partir de tomates, após 5 minutos à temperatura de 90°C. Outros fatores também influenciam a atividade enzimática, entre estes: pH e a composição iônica do fluido apoplástico (Paiva et al., 2009).

#### 2.4.2. Pectinametilesterase (PME)

São enzimas que catalisam a desmetilação do grupo carboxílico em unidades de ácido galacturônico, desempenhando um papel importante na determinação da extensão, à qual a pectina é acessível à degradação por PG. Também os grupos metil-éster hidrolisados pela PME podem servir de substrato às PGs ou ficarão disponíveis para ligações cruzadas intermoleculares mediadas por  $\text{Ca}^{2+}$  (Lima, 2002).

As PMEs estão presentes especialmente na lamela média, por isso, muitas vezes, as paredes celulares apresentam grandes quantidades de substâncias pécticas metiladas, mesmo com um número suficiente de PME para desmetilá-las (Ros et al., 1992). As PMEs têm se mostrado envolvida no mecanismo de maturação dos frutos (Scalon, 1999; Lima, 2002).

#### 2.5. Inativação enzimática

A inativação enzimática objetiva principalmente a conservação do produto, em seu período de elaboração e armazenamento. A inibição enzimática pode ser realizada por diferentes métodos, como por exemplo: o uso de aditivos inibidores como  $\text{CaCl}_2$  e ácido ascórbico; mudanças de pH; exclusão do oxigênio por embalagem a vácuo ou emprego de atmosfera modificada; o congelamento e o tratamento pelo calor (Cunha, 2005).



### 2.5.1. Efeitos do $\text{Ca}^{2+}$

Em frutos, o efeito do  $\text{Ca}^{2+}$  tem recebido muita atenção, visto que os seus íons se ligam ao ácido poligalacturônico na lamela média, sendo essencial para reforçar a parede celular e os tecidos das plantas (Figura 3). As pontes de  $\text{Ca}^{2+}$  entre os ácidos pécticos ou entre os outros polissacarídeos dificultam o acesso e a ação de enzimas pectolíticas produzidas pelo fruto e que causam amaciamento, e daquelas produzidas pelos fungos e bactérias que causam deterioração (Mota et al., 2002). Além disso, na própria lamela média, na superfície externa da membrana plasmática, no retículo endoplasmático e nos vacúolos, são encontradas altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ , comprovando a sua importância para a integridade dos tecidos vegetais (Marschner, 1995).

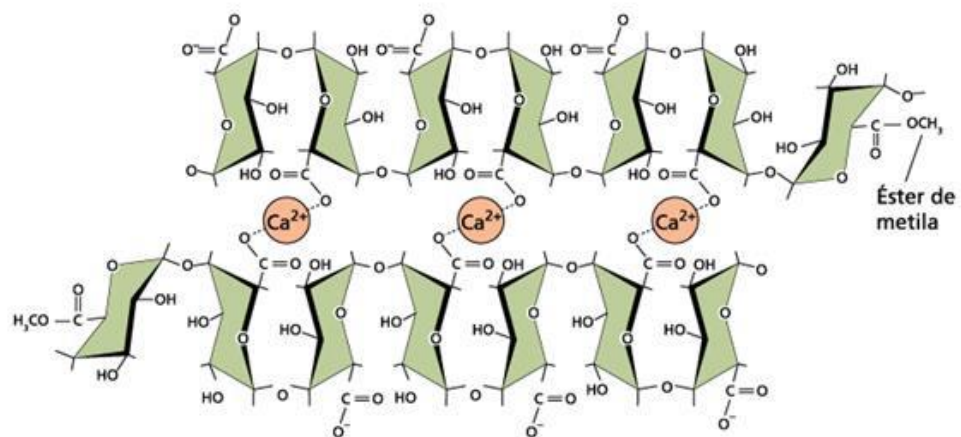


Figura 3. Estrutura poligalacturônica que compõe a pectina (Taiz e Zeiger, 2009).

### 2.5.2. Tratamento térmico

O tratamento térmico em frutos tem uma variedade de funções, destacando-se a inativação de enzimas causadoras do escurecimento, a fixação da cor, aroma e sabor da fruta, a eliminação de ar dos tecidos evitando oxidações, aumento do rendimento do produto, garantia de maior eficiência energética, controle de temperatura, eliminação de sabores estranhos, menores perdas de substâncias solúveis em água, menores volumes de efluentes, facilidade de limpeza e esterilização, torna a consistência da fruta firme e tenra, reduz a carga microbiana superficial, e aumenta a qualidade e vida útil do vegetal (Pereda et al., 2005).

No entanto, alguns vegetais sofrem perdas consideráveis na qualidade se o tratamento térmico não for realizado adequadamente. Para conseguir uma inativação enzimática adequada, o alimento deve ser aquecido rapidamente a uma temperatura pré-determinada, mantido durante um tempo estabelecido e rapidamente resfriado a temperatura ambiente. Os fatores que influenciam o tempo de tratamento térmico são o tipo de fruta, o tamanho dos pedaços, a temperatura de branqueamento e o método de aquecimento (Fellows, 2006).

Segundo Duvetter et al. (2009), a aceleração da atividade catalítica das enzimas durante o processamento térmico, está relacionada com o aumento da energia cinética das moléculas até a temperatura ótima para, além da qual, ligações intra e intermolecular são quebradas, levando a inativação ou desnaturação das enzimas.

Efeitos desejados do tratamento térmico incluem a inativação enzimática e esterilização do alimento, enquanto que os efeitos adversos incluem a perda de nutrientes, tais como ácido ascórbico, a perda de gases intercelulares e mudanças nas propriedades sensoriais e estrutura microscópica de, por exemplo, legumes. O grau em que qualquer uma dessas alterações ocorre é influenciado pelos processos de transferência de calor e massa combinados, que ocorrem durante o processo. Do ponto de vista da qualidade do produto, os efeitos adversos de tratamento devem ser minimizados (Arthey e Dennis, 1991).

Os dois métodos industriais mais comuns de tratamento térmico envolvem a passagem do alimento através de uma atmosfera de vapor saturado ou um banho de água quente. Quando o tratamento térmico for a partir de vapor, faz-se o uso de esteira transportadora e/ ou túnel com uma atmosfera de vapor. Já, quando o processo é feito através do uso de água quente, este processo pode ser realizado em branqueadores rotatórios ou branqueadores tubulares e, este tratamento térmico brando faz uso de temperaturas entre 70 e 100°C e tempos variáveis (Fellows, 2006).

### 2.5.3. Alteração do pH

As enzimas, em sua maioria, são ativas apenas em uma estreita faixa de pH, normalmente entre 5 e 9. O estado de ionização do substrato, do produto ou do inibidor, pode influenciar a reatividade da enzima, dependendo da natureza

das interações que a permitem ligarem e transformarem esses ligantes. Desse modo, a ionização das cadeias laterais dos aminoácidos da enzima pode modular a seletividade da reação entre substratos potenciais. Por exemplo, muitas proteases exibem pHs ótimos diferentes para a atividade hidrolítica contra diferentes substratos proteicos (Damodaran et al. 2010)

PMEs parecem ser muito sensíveis ao seu ambiente iônico e são geralmente estreitamente reguladas por pH. A maioria das PMEs de plantas apresentam um pH ótimo entre 6 e 8, enquanto que para as PMEs microbianas é entre pH 4 e 9. Geralmente, a atividade da PME aumenta com o aumento da concentração de cátions até um valor ideal, acima do qual a atividade normalmente diminui. As concentrações ótimas dependem da natureza do cátion. As plantas podem regular a atividade da PME através do controle da concentração iônica no interior da parede da célula. Pode-se imaginar dentro da parede celular, micro-domínios onde as concentrações iônicas são adequadas para a libertação de enzimas (Duvetter et al., 2009).

Tal como PMEs, PGs são sensíveis ao seu ambiente iônico. O pH ótimo para a atividade da PG está na dependência da fonte e a isoforma PG dentro da fonte. A dependência do pH suporta a ideia de que a composição mineral e o pH do apoplasto da fruta, proporciona um meio para regulação bioquímica do metabolismo da parede celular (Almeida e Huber, 2007).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

As etapas de processamento do maracujá para obtenção da farinha fracionada da casca (farinha do albedo) estão indicadas na Figura 4. O foco central foi a definição do melhor tratamento para inativação enzimática da PG, umas das enzimas responsáveis por degradar as substâncias pécicas da parede celular do tecido do albedo, com o intuito de preservar a qualidade da pectina obtida de farinha do albedo de maracujá.

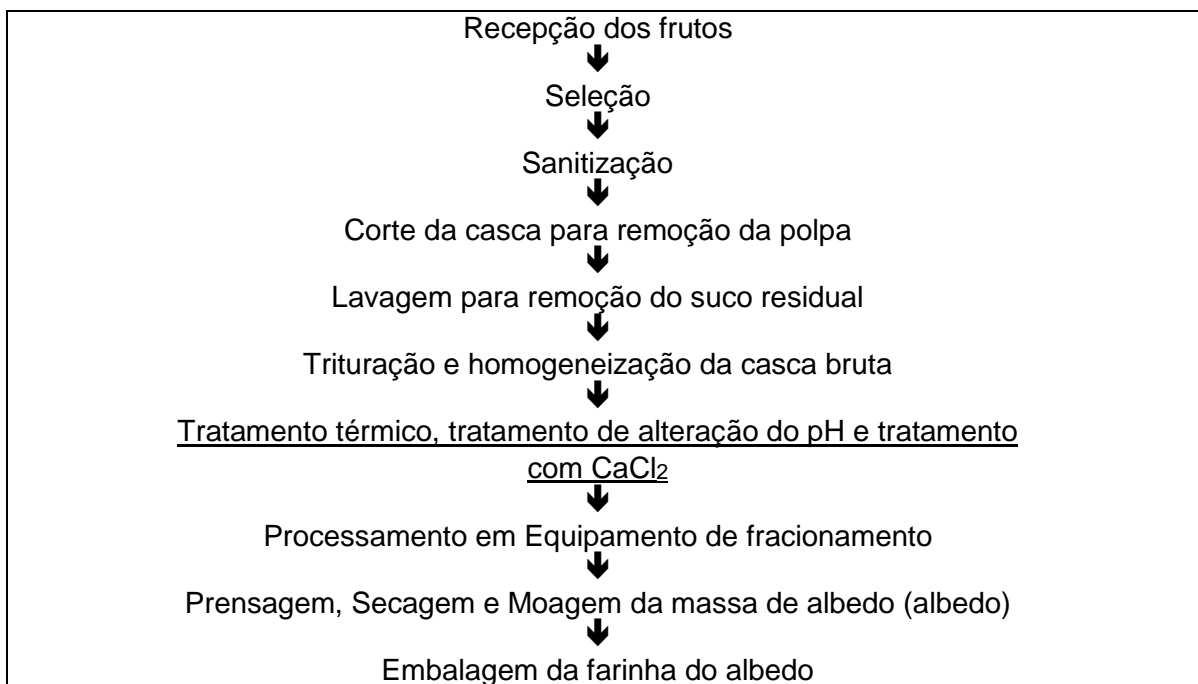


Figura 4. Fluxograma de processamento da casca do maracujá para obtenção da farinha fracionada do albedo.

### 3.1. Experimento I: Tratamento térmico visando à inativação da PG presente no albedo homogeneizado

#### 3.1.1. Matéria-prima

Aproximadamente 450 frutos de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis Sims*) foram colhidos em lavoura comercial do município de São José de Ubá – RJ, no período da manhã, sendo padronizados com o mesmo estágio de maturação (intermediário), apresentando a casca com coloração verde-clara. Os frutos foram embalados cuidadosamente em caixas plásticas e transportados para o laboratório onde foram lavados e sanitizados com solução de cloro (100 ppm/ 15 minutos). Em seguida, os frutos foram secos e armazenados sobre estantes em câmara de refrigeração mantida a 10°C e 85-95 % UR. Este procedimento visou preservar a qualidade e minimizar alterações no padrão de maturação dos frutos antes do processamento.

A coloração da casca foi caracterizada usando um colorímetro da marca *Hunterlab Miniscan Spectrophotometer Plus*, iluminante D65, ângulo de observação de 10°, sendo os resultados expressos pelo sistema *L, a, b* de Hunter. As leituras foram realizadas em pontos equidistantes das faces expostas e não expostas do fruto ao sol na planta. A proporção de cor amarela na casca foi obtida conforme Silva et al. (2008), apresentado na Equação 1.

$$\text{Proporção cor amarela (\%)} = \frac{\text{Hunter } b \text{ (int)} - \text{Hunter } b \text{ (ver)}}{\text{Hunter } b \text{ (mad)} - \text{Hunter } b \text{ (ver)}} * 100 \quad (\text{eq.1})$$

Em que:

Hunter *b* (ver): Média da leitura do parâmetro de Hunter *b* nos frutos verdes;

Hunter *b*(int): Média da leitura do parâmetro de Hunter *b* nos frutos intermediários;

Hunter *b* (mad): Média da leitura do parâmetro de Hunter *b* nos frutos maduros.

#### 3.1.2. Processo de homogeneização da casca bruta dos frutos

Aproximadamente 12 frutos foram processados obtendo um padrão de massa de casca de 1 kg, que foi utilizado em cada tratamento. Os frutos foram cortados ao meio, utilizando faca de aço inoxidável e após a remoção do endocarpo (polpa) por meio de espátula, o material da casca foi lavado com água

destilada para remoção de resíduos de suco. As cascas foram cortadas em pequenos pedaços para facilitar a homogeneização e foram imediatamente processadas em aparelho liquidificador adaptado com tela de diâmetro de 1,5 mm, evitando a presença de partículas grandes que agregam o material do epicarpo. O material da casca foi alimentado no interior da tela do liquidificador e processado sob condições controladas de agitação, utilizando um fluxo de água destilada que facilitou o arraste das partículas para o recipiente que contém o material homogeneizado (Figura 5).

O material proveniente da homogeneização da casca bruta foi colocado em repouso em um recipiente para decantação do epicarpo e a separação do albedo que foi recolhido e imediatamente prensado em malha de tecido sintético, para remoção do excesso de água, e pesado em balança semi-analítica, obtendo um padrão de 1 kg de material homogeneizado do albedo.



Figura 5. Sistema de homogeneização da casca bruta constituído de 1 tanque de água destilada que alimenta o aparelho liquidificador contendo um cilindro de tela com o dilacerador na base do copo e tubulação de descarga da água de arraste das partículas da casca do maracujá. O liquidificador possui dispositivo de controle de velocidade de rotação das lâminas dilaceradoras

### 3.1.3. Tratamento Térmico

Após testes preliminares em laboratório, foi selecionada a temperatura de 90°C por 4 horas para o tratamento térmico, e, a proporção massa bruta /água destilada de 1/32 (p/v). O tratamento térmico foi estudado em um banho ultra termostático (SOLAB, SL 130/42), mostrado na Figura 6. O equipamento consistiu da seguinte estrutura: 1) cuba de tratamento térmico em aço inox com formato cilíndrico e base cônica, revestida por uma camisa com capacidade para 20 litros de fluido refrigerante (solução de etilenoglicol). Apresenta ainda um agitador mecânico para garantir a homogeneidade da mistura na cuba de tratamento; 2) tanque de aquecimento com capacidade para 40 litros de fluido de aquecimento (solução de etileno glicol a 25 %); 3) tanque de resfriamento com capacidade para 110 litros de fluido refrigerante (solução de etileno glicol a 35%); 4) Bomba peristáltica para circular a água de suspensão do material dentro da cuba (vazão de 1000 L min<sup>-1</sup>) e 5) Tanque para drenagem dos fluidos contidos na camisa da Cuba.

Os dois tanques de tratamento térmico são ligados à camisa da cuba. Desta forma, durante o aquecimento, a cuba é banhada externamente pelo fluido quente durante um intervalo de tempo pré-determinado. O choque térmico é conseguido quando o fluido quente é drenado e substituído pelo fluido frio que opera em uma temperatura de -18° C, possibilitando o abaixamento rápido da temperatura do material suspenso em água no interior da cuba, alcançando a temperatura ambiente dentro de 3 minutos. A água de suspensão do material dentro da cuba é circulada por meio da bomba peristáltica que está conectada no fundo da cuba e circula por meio de serpentina de 1 cm de diâmetro que envolve a parte externa da cuba (em contato com o fluido térmico) e descarrega a água de suspensão na parte superior da cuba. Desta forma, além da agitação mecânica da água de suspensão dentro da cuba, promove-se também um aquecimento adicional da água de suspensão que circula através da serpentina banhada pelo fluido na camisa da cuba. As condições de temperatura de tratamento térmico são avaliadas por termopares instalados na base da cuba e na posição de descarga da água de suspensão para dentro da serpentina.



Figura 6: Tanque de tratamento térmico (SOLAB, SL 130/42). Legenda: (1) cuba de tratamento térmico; (2) tanque de aquecimento; (3) tanque de resfriamento; (4) bomba peristáltica para circular a água de suspensão do material dentro da cuba e (5) Tanque para drenagem dos fluidos contidos na camisa da Cuba.

O material homogeneizado, conforme o item 3.1.2, foi colocado em um volume de 32 litros de água destilada, previamente aquecida à 90°C, e mantido sob agitação mecânica constante durante o intervalo de tempo de 4 horas. Posteriormente, o material foi rapidamente resfriado no próprio tanque através de um banho de congelamento acoplado ao tanque de tratamento térmico.

Após o resfriamento do material dentro da cuba, foi realizada a descarga pela válvula localizada na base do tanque, recolhendo o material com auxílio de um balde onde ficou em repouso para a separação das fases albedo e epicarpo. O albedo foi recolhido e prensado manualmente em malha de tecido sintético para remoção do excesso de água.

O tratamento controle apresentou as mesmas condições que foram utilizadas para o tratamento térmico, porém o material foi mantido à temperatura ambiente, sob agitação mecânica constante durante o intervalo de tempo de 4 horas.

Amostras foram retiradas para a caracterização inicial do material controle após a homogeneização, mas sem o tratamento térmico por 4 horas.

Após os tratamentos, os materiais foram embalados em papel alumínio, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer a - 80°C.



#### 3.1.4. Determinação da atividade da enzima PG

Para a extração da enzima PG foram feitas adaptações ao método descrito por Silva (2006). Após a homogeneização descrita no item 3.1.2. 10 gramas do albedo foram triturados durante 5 minutos, a 4°C, em Turratex, com 20 ml de solução tampão de acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0, contendo 1 M de NaCl, e 1% de PVPP (polivinilpolipirrolidona). Posteriormente, foram filtrados em duas camadas de tecido de algodão e centrifugado a 15.000 rpm por 30 minutos em uma centrífuga refrigerada a 1° C.

Para o cálculo da atividade enzimática, os açúcares liberados pela reação enzimática foram determinados utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959), em que se adicionou 0,2 ml do sobrenadante a uma solução de 2,0 ml de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 3.6, contendo 0,45% de ácido poligalacturônico. Em seguida, a mistura foi incubada a 45° C e após o período de uma hora a reação foi paralisada pela adição de 1,0 ml de ácido 3,5 dinitrossalicílico. A mistura foi colocada banho-maria fervente por 10 minutos e resfriada em banho de gelo. A coloração desenvolvida foi medida em espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 540 nm. Uma unidade de atividade foi considerada como sendo a quantidade de enzima capaz de gerar 1µmol de ácido galacturônico por minuto.

#### 3.1.5. Delineamento experimental

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 repetições para cada tratamento. Os resultados foram interpretados pelo programa GENES (Cruz, 2001), para comparação entre as médias, utilizando-se o teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

#### 3.1.6. Efeito da temperatura na inativação da PG em extrato enzimático do albedo do maracujá

Para avaliar a perda da atividade da PG, o sobrenadante obtido após extração enzimática foi incubado em banho-maria nas temperaturas de 65, 75 e 85° C, retirando-se amostras em intervalos de 5 min, até completa inativação da

enzima. As alíquotas foram imediatamente acondicionadas em banho de gelo para posterior ensaio de atividade como descrito no item 3.1.4.

Os resultados foram expressos como atividade residual (%) em função da atividade máxima encontrada na amostra que não passou por inativação enzimática (Oliveira, 2013).

Para cada temperatura e intervalo de inativação, foram analisadas 3 repetições.

## 3.2. Experimento II: Influência da alteração do pH do albedo homogeneizado

### 3.2.1. Matéria-prima

Os frutos foram colhidos e processados conforme descrito no Item 3.1.1 e 3.1.2.

### 3.2.2. Tratamentos com alteração do pH da casca bruta homogeneizada

Para o método de tratamento com alteração do pH, a casca bruta homogeneizada foi imersa em 31.800 ml de água e 200 ml de tampão e agitada a 400 rpm por 1 hora (Figura 7). Os tampões utilizados foram: tampão acetato de sódio (pH 4-5), tampão fosfato (pH 6-8) e tampão carbonato/bicarbonato (pH 9-10). O pH do meio foi verificado no início e final do tratamento com auxílio de um potenciômetro de bancada.

Após o tratamento, o albedo foi separado e prensado manualmente em malha de tecido sintético para remoção do excesso de água (Figura 8).

O tratamento controle foi realizado nas mesmas condições de ensaio, contudo, no lugar do tampão foi completado o volume com água destilada.



Figura 7: Processo de agitação da casca bruta do maracujá durante o tratamento químico.



Figura 8: Albedo em malha de tecido sintético para remoção do excesso de água.

### 3.2.3. Delineamento experimental

O delineamento estatístico utilizado nestes testes foi o inteiramente casualizado com 3 repetições para cada tratamento. Os resultados foram interpretados pelo programa GENES (Cruz, 2001), para comparação entre as médias, utilizando-se o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### 3.3. Experimento III: Determinação das condições de tratamento com $\text{Ca}^{2+}$ visando à inativação enzimática da PG presente no albedo homogeneizado

#### 3.3.1. Matéria-prima

Os frutos foram colhidos e processados conforme descrito no Item 3.1.1 e 3.1.2.

#### 3.3.2. Tratamentos com $\text{Ca}^{2+}$

A casca bruta homogeneizada foi agitada a 400 rpm por 1 hora com o auxílio de um agitador mecânico (marca Fisatom 713D) em soluções de  $\text{CaCl}_2$  contendo as seguintes concentrações: 0,01 e 1% de íons de Cálcio. A proporção de casca bruta do maracujá homogeneizada foi de 1 Kg para 32 litros de solução. Após o tratamento, o albedo foi separado por densidade e prensado manualmente em malha de tecido sintético para remoção do excesso de água. Os dois níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  foram escolhidos a partir de testes preliminares, em que a concentração de 0,01% ainda foi identificada atividade enzimática de PG e a concentração de 1% bloqueou a ação da enzima PG.

O tratamento controle consistiu nas mesmas condições do ensaio, contudo, sem a adição dos íons de cálcio em meio aquoso.

#### 3.3.3. Delineamento experimental

O delineamento estatístico utilizado para os testes, foi o inteiramente casualizado, com 5 repetições para cada tratamento. Os resultados foram interpretados pelo programa GENES (Cruz, 2001), para comparação entre as médias, utilizando-se o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

### 3.4. Experimento IV: Grau de esterificação da pectina extraída do albedo homogeneizado e tratado com diferentes concentrações de $\text{Ca}^{2+}$

A partir dos tratamentos descritos nos experimentos I, II e III que visaram inativar ou bloquear a ação da enzima PG, foram identificados os tratamentos com íons de cálcio sendo os mais eficientes no bloqueio da atividade enzimática.

#### 3.4.1. Tratamento e processamento do albedo para fabricação da farinha do maracujá-amarelo

A casca bruta homogeneizada foi tratada com 0,01 e 1 % de  $\text{Ca}^{2+}$  conforme o item 3.3.1. Posteriormente, o albedo foi prensado em malha de tecido sintético e separado em 3 parcelas. A primeira parcela (0 hora após o tratamento) foi imediatamente desidratada sobre tela sintética em secador de bandejas (Marca Pardal) com circulação forçada de ar, em temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$  por 20 horas e triturada em moinho analítico (Marca Quimis) até obter a granulometria de 0,297 mm (Figura 9). A farinha do albedo foi armazenada até o momento da caracterização da pectina. Após 12 e 24 horas, exposta a temperatura ambiente, previamente à secagem, a segunda e terceira parcela passaram pelo mesmo procedimento anterior. Desta forma, foi possível avaliar o intervalo de tempo em que a casca bruta homogeneizada e tratada poderia ser deixada exposta à temperatura ambiente, em condições de sobrecarga na indústria do processamento do material para obtenção da farinha, sem que houvesse degradação da pectina.

O controle passou pelo mesmo procedimento, contudo, não recebeu tratamento com íons de cálcio.



Figura 9. Processo de trituração da farinha do albedo. Legenda: (1) moinho analítico (Marca quimis); (2) peneira gramatura de 0,297 mm.

### 3.4.2. Extração das substâncias pécticas

As análises de quantificação e caracterização química das substâncias pécticas foram conduzidas no laboratório de Bioquímica da Embrapa Agroindústria de Alimentos- Rio de Janeiro. A extração e o isolamento das pectinas foram realizados de acordo com Scabio et al. (2007) apud Fertoni et al. (2009) com modificações, sendo o ácido nítrico utilizado como agente extrator.

As farinhas do albedo (1 g), obtidas conforme citado no item 3.4.1, foram suspensas em 25 mL de água e preparou-se uma solução ácida de igual volume, a partir da diluição de ácido nítrico 1M. A suspensão ácida apresentou razão final sólido-líquido 1: 50 (p/v). Ambos os frascos foram aquecidos até a temperatura de extração e os conteúdos foram misturados em banho-maria com agitação a 80°C, sendo cronometrado o tempo de extração estabelecido de 20 minutos. Após esse período, o processo de extração foi interrompido por imersão do recipiente com a suspensão ácida em banho de água e gelo.

Para o isolamento da pectina solúvel, o resíduo sólido foi separado por filtração em funil e algodão. Ao líquido filtrado, foram adicionados três volumes de etanol a frio (4°C) e agitou-se vigorosamente. O material ficou em repouso por aproximadamente 15 horas (*overnight*), para a separação do gel de pectina. Em seguida, o material foi centrifugado a 4500 rpm por 30 minutos a 10°C e o *pellet* foi submerso em acetona por 10 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado novamente a 4500 rpm por 15 minutos a 10°C.

O material foi conduzido à estufa de circulação a 37 °C por cinco horas. Depois foi congelado, liofilizado e pesado.

### 3.4.3. Avaliação do grau de esterificação das pectinas obtidas da farinha do albedo

A avaliação da pectina foi conduzida com base no grau de esterificação do ácido D-galacturônico, segundo Bocek et al. (2001), com adaptações.

O grau de esterificação (DE) é o número de grupos carboxílicos esterificados pelo total de número de grupos carboxílicos. Assim, o DE foi determinado de acordo com a seguinte equação:

$$DE = \left( \frac{K_e}{K_t} \right) * 100$$

Em que:  $K_e$  = número de grupos carboxílicos esterificados,  $K_t$  = número total de grupos carboxílicos ( $K_e + K_t$ ).

Num béquer, foi pesado 0,2 g de pectina, umedecendo-a com 200  $\mu$ L de álcool etílico p.a. (95 %). Em seguida, foram adicionados 20 mL de água destilada. A solução foi mantida em agitação a 200 rpm e temperatura de 30°C por 24 horas em shaker, posteriormente, titulou-se com solução de NaOH 0,1N em presença de fenolftaleína. A reação foi determinada até o pH alcançar o valor de 8,5, usando um potenciômetro de bancada.

O percentual de grupos carboxílicos livres foi determinado a partir da seguinte equação:

$$K_f \% = \frac{N_{NaOH} \times V_{NaOH} \times 0,045 \times 100}{a} \quad (2)$$

Em que:  $K_f$  : Quantidade de grupos carboxílicos livres (%), a: massa de pectina utilizada (g),  $N_{NaOH}$ : Normalidade da solução alcalina,  $V_{NaOH}$ : Volume da solução alcalina gasto durante a titulação (mL), 0,045: peso equivalente do grupo carboxílico.

Para a determinação do número de grupos carboxílicos esterificados ( $K_e$ ) adicionou-se 10 mL de NaOH 0,1N na amostra neutralizada, após a determinação dos grupos carboxílicos livres. O béquer foi tampado e a solução foi agitada por 2 horas a 400 rpm, ocorrendo assim a saponificação dos grupos carboxílicos esterificados do polímero. Adicionou-se 10 ml de HCl 0,1 N à solução. O excesso de HCl foi titulado com NaOH 0,1N até o valor de pH 8,5. O número de grupos carboxílicos esterificados foi determinado a partir da seguinte equação:

$$K_e \% = \frac{N_{NaOH} \times V_{NaOH} \times 0,045 \times 100}{a}$$

Em que:  $K_e$ : Quantidade de grupos carbóxi esterificados (%), a: massa de pectina utilizada (g),  $N_{NaOH}$ : Normalidade da solução alcalina,  $V_{NaOH}$ : Volume da solução alcalina gasto durante a titulação, em mL.

#### 3.4.4. Delineamento Experimental

Para a análise do DE ácidos carboxílicos livres e esterificados individualmente, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições no modelo de parcelas subdivididas compostos de 2 fatores: Parcelas (tratamento 0, 0,01 e 1% de  $\text{Ca}^{2+}$ ) e subparcelas (tempo de exposição à temperatura ambiente de 0, 12 e 24 horas). Os resultados foram interpretados pelo programa ASSISTAT 7.7 beta, para comparação entre as médias, utilizando-se o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização da Matéria-Prima utilizada nos experimentos

Na análise de cor da casca, constatou-se que os frutos apresentaram 5,04 % de coloração amarela, com desvio padrão de 2,83. Os frutos foram classificados no estágio de maturação 2, na escala de cor da casca para sete estágios de maturação do maracujá-amarelo, conforme Silva et al. (2008).

Aina e Oladunjoye (1993) estudaram a variação de cor da manga durante o período de armazenagem e identificaram um aumento no índice de cor, ao mesmo tempo em que foi registrado um aumento da atividade da PG.

De acordo com Chitarra e Chitarra (2005), a hidrólise das pectinas tem uma tendência a aumentar com o amadurecimento dos frutos, devido à ação das enzimas pectolíticas. Desta forma, a utilização dos frutos no estágio de maturação 2, permitiu a obtenção de uma matéria-prima onde as enzimas degradantes ainda não estavam atuando intensamente na hidrólise da pectina.

### 4.2. Experimento I: Tratamento térmico visando à inativação da PG presente no albedo homogeneizado

#### 4.2.1. Efeitos do binômio temperatura/tempo na inativação da PG em extrato enzimático obtido do albedo

As atividades relativas da PG em extrato enzimático do albedo da casca do maracujá, em função do tempo de incubação, nas 3 temperaturas estudadas, estão apresentadas na Figura 10. Quando a PG foi incubada à temperatura de 85 °C, ocorreu total desnaturação da enzima em 10 minutos. Rodrigo et al. (2006), ao estudarem a inativação da PG em extrato enzimático de tomates, obtiveram desnaturação total à temperatura de 90 °C por 5 minutos.

Já em temperaturas mais baixas, a enzima apresentou termorresistência quando incubada as temperaturas de 65 °C e 75 °C, ocorrendo inativação em 30 e 20 minutos, respectivamente.

Ainda, analisando a Figura 10, a enzima perdeu 80% da atividade após 20 minutos a 65°C, mostrando maior resistência térmica quando comparada à PG purificada de abacate, que após a incubação por 5 minutos a essa temperatura, perdeu 80% da atividade (Wakabayashi e Huber, 2001).

Estudar os mecanismos de inativação das pectinases é fundamental para a indústria de alimentos (Duvetter et al., 2009). Neste caso, foi importante conhecer os parâmetros de inativação da PG em sobrenadante, obtendo assim, um ponto de partida para aplicar os tratamentos térmicos no material homogeneizado da casca bruta de maracujá, procurando preservar as características químicas da pectina presente na farinha do albedo.

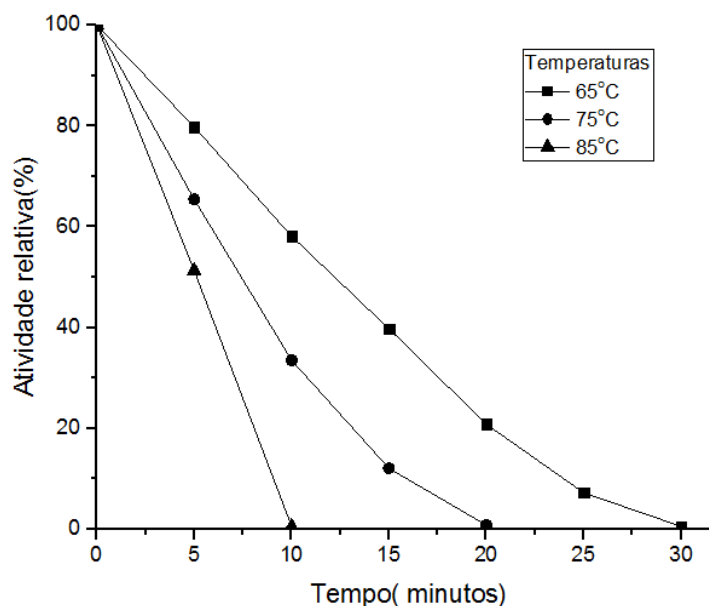


Figura 10. Atividade relativa da PG (%) em função do tempo de tratamento térmico do extrato enzimático do albedo, para as temperaturas de 65°, 75°C e 85°C. Os pontos experimentais representam as médias de 3 repetições. (100% de atividade =  $1.91 \text{ U.ml}^{-1}$ ).

#### 4.2.2. Tratamento Térmico da casca bruta de maracujá homogeneizada

Os ensaios preliminares da dinâmica de operação do Tanque de Tratamento Térmico mostraram que o fluido de tratamento térmico (tanque de aquecimento) atinge a temperatura de 90°C em 90 minutos (Figura 11). No entanto, o fluido de resfriamento (tanque de congelamento) demora 100 minutos para atingir a temperatura de -18 °C (Figura 12). Desta forma, a estabilização das temperaturas nos tanques de aquecimento e de congelamento para a realização dos testes de branqueamento do material em suspensão demanda pelo menos 100 minutos para o início de cada repetição de tratamento térmico.

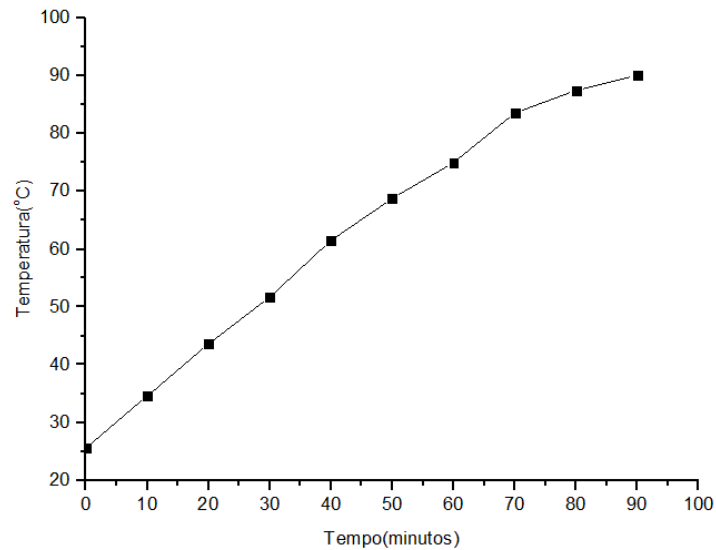


Figura 11. Histórico de temperatura do tanque de aquecimento do banho ultratermostático (SOLAB, SL 130/42) com a cuba contendo um volume de 32 L de água de suspensão.

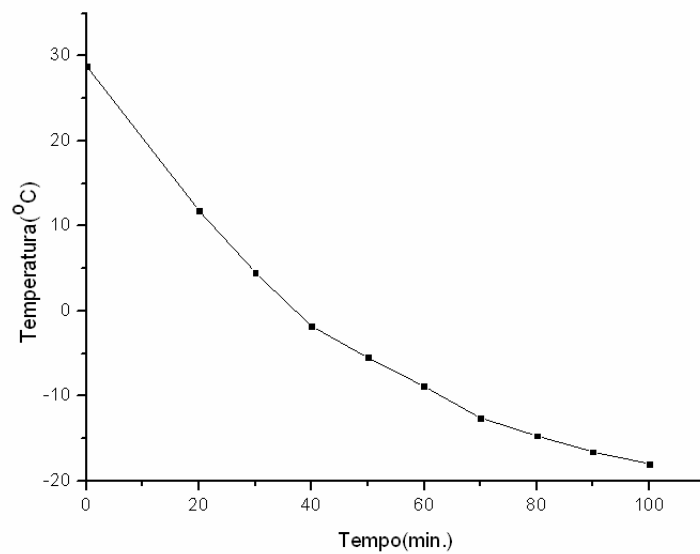


Figura 12. Histórico de temperatura do tanque de resfriamento do banho ultratermostático (SOLAB, SL 130/42) com a cuba contendo um volume de 32 L de água de suspensão.

Testes preliminares, com o intuito de chegar a uma proporção de casca homogeneizada capaz de não esfriar a água pré-aquecida a 90°C ao adicionar a casca homogeneizada, demonstraram que a proporção 1/32 (kg/L) de casca homogeneizada/água, como a ideal. A casca homogeneizada manteve-se durante as 4 horas na temperatura de 90°C, sendo a leitura da temperatura feita através de termopares no interior da cuba. Após as 4 horas, o fluido quente circulante da camisa da cuba foi drenado rapidamente e o tanque de resfriamento acionado, enviando o fluido à base de etilenoglicol a -20°C para a camisa da cuba, assim, em 9 minutos a casca homogeneizada chegou à temperatura de 35°C. O tanque de resfriamento mostrou-se eficaz, e apenas após 5 minutos de troca de calor na camisa da cuba, a temperatura do tanque começou a aumentar, saindo dos -20°C para 0°C entre 5 a 7 minutos (Figura 13).

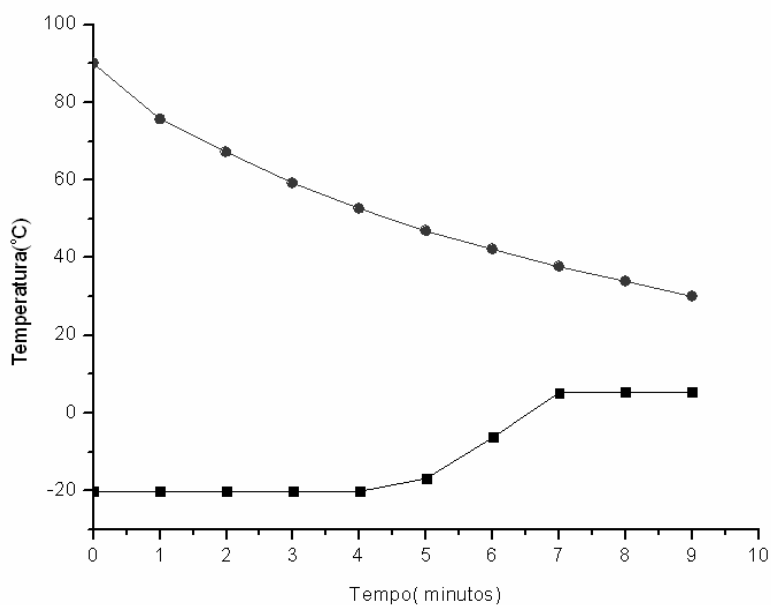


Figura 13. Histórico de temperatura de resfriamento da solução de suspensão da massa homogeneizada na cuba, usando a proporção 1/32 (kg/L) de casca homogeneizada/água. Legenda: (●) temperatura da solução de suspensão do material homogeneizado e (■) temperatura do tanque de resfriamento (SOLAB, SL 130/42).

Conforme encontrado o binômio/temperatura de inativação da PG em extrato enzimático obtido do albedo de maracujá, ensaios preliminares foram realizados para encontrar um binômio tempo-temperatura capaz de inativar a enzima PG presente em casca bruta homogeneizada. Contudo, o tratamento térmico aplicado na casca bruta homogeneizada não obteve sucesso de total inativação como no extrato enzimático, provavelmente, os tecidos impediram com que ocorresse a inativação da enzima. Sendo assim, foi escolhido o tratamento térmico a 90°C por 4 horas, para estudar a inativação da enzima, tendo em vista que o aumento do tempo de aquecimento provocou escurecimento do albedo.

Conforme mostrado na Figura 14, a atividade da PG após o tratamento térmico a 90°C diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) do tratamento controle, inativando em 50% a enzima PG no material homogeneizado do albedo. Já em relação à caracterização inicial, o tratamento térmico não diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ), mantendo o albedo sem aumento da atividade da PG, mesmo após 4 horas. A atividade da PG elevada, observada no tratamento controle em comparação com a caracterização inicial, poderia ser explicada pelo estresse induzido pelas operações de agitação e devido ao tempo reacional do material à temperatura ambiente, sem nenhum tipo de tratamento para controlar a atividade da PG.

O tratamento térmico não foi capaz de inativar totalmente a enzima PG, estando de acordo com Alvim e Clemente (1998), que avaliaram as enzimas PG como termorresistentes. A presença de enzimas termorresistentes pode causar problemas no tratamento térmico da maioria dos vegetais. O projeto de tratamentos térmicos eficientes requer o conhecimento de fatores críticos, como a distribuição enzimática dentro do tecido, parâmetros cinéticos de inativação e estabilidade térmica da enzima em extrato bruto. Este tipo de informação não é geralmente disponível na literatura e é exclusivo para cada vegetal, espécie, cultivar e, é influenciada pelas condições ambientais, entre outros fatores (Prasath et al, 2010).

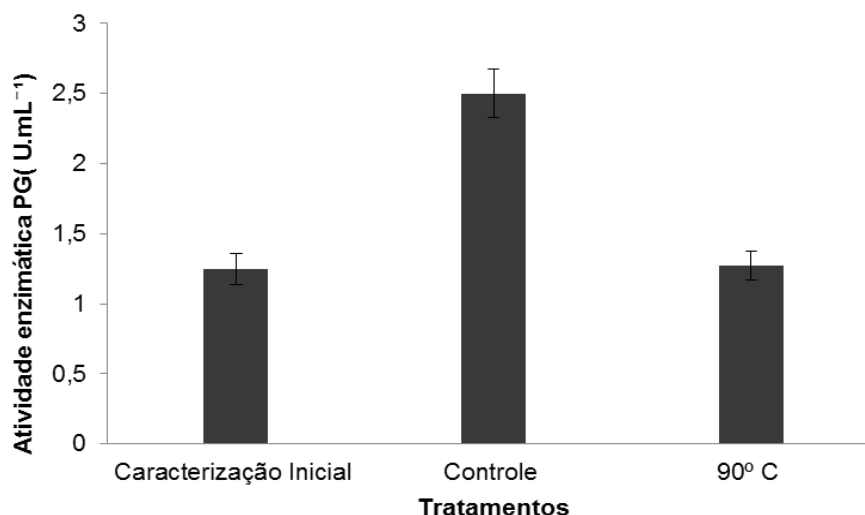


Figura 14 - Influência do tratamento térmico na atividade da enzima PG no material homogeneizado do albedo de maracujá. Caracterização inicial (albedo homogeneizado e atividade avaliada imediatamente), Controle (albedo homogeneizado e agitado durante 4 horas a temperatura ambiente) e tratamento térmico (albedo homogeneizado e agitado durante 4 horas à temperatura de 90 °C). Médias de 5 repetições para cada tratamento.

O fato de a enzima ser mais resistente na casca bruta homogeneizada do que no extrato enzimático deve-se ao fato de que ligantes (substratos ou mesmo inibidores) aumentam a estabilidade por ajudar a reter a estrutura nativa no sítio ativo ou ao seu redor. Outros fatores de composição no meio também podem aumentar a estabilidade térmica, como por exemplo, as fibras. (Damodaran et al., 2010).

Tradicionalmente, o processamento térmico maior ou igual a 90°C é muito usado na conservação de alimentos. No entanto, a exposição à alta temperatura, muitas vezes pode causar mudanças prejudiciais no produto processado, o que pode incluir alterações indesejáveis nos aspectos nutricionais e organolépticos (atributos de textura, cor etc...). A extensão destas perdas depende da natureza do processo de aplicação e as combinações de tempo e temperatura (Buggenhout et al., 2009). O tratamento térmico visando inativar a enzima em casca bruta homogeneizada do maracujá mostrou-se ineficiente na temperatura estudada, sendo que, além de não ocorrer inativação da enzima, mostrou-se como um processo economicamente inviável para a indústria de processamento do maracujá, devido ao longo tempo de tratamento e sem resultados desejáveis. Contudo, são resultados que demonstram que os experimentos para realização

de inativação da PG em extrato enzimático não refletem o verdadeiro comportamento da enzima, quando a mesma se encontra na casca bruta homogeneizada.

#### 4.3. Experimento II: Influência da alteração do pH do albedo homogeneizado visando à inativação da PG

Estudos apontam o pH entre um dos fatores determinantes da eficiência enzimática. Valores altos ou baixos de pH podem causar desnaturação proteica e, conseqüentemente, inativação enzimática. Por isso, é muito útil saber em que faixa de pH a enzima é mais estável. A cinética enzimática qualitativa e quantitativa mostra que as enzimas respondem de forma previsível em sistemas ideais simples, como os usados para classificar e caracterizar as enzimas extraídas de materiais biológicos (Food Ingredients Brasil, 2011). Contudo, não foi encontrado na literatura consultada, nenhum estudo sobre aplicações de tratamentos alterando o pH do material biológico e, posteriormente, extraído a enzima para avaliar a sua atividade enzimática. Os estudos concentram em avaliar os efeitos do pH sobre a atividade enzimática após extração celular.

Diante do exposto, o objetivo foi avaliar se há algum efeito sobre a enzima, quando o albedo do maracujá homogeneizado é mantido em diferentes valores de pH no período de 1 hora e sob agitação constante.

Analisando a Tabela 2, o tratamento controle (pH 6 sem adição de tampão) diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) do tratamento em pH 6 (tampão fosfato de sódio), reduzindo em 36% a atividade de PG. Para a ligeira inibição da enzima pode ser que os grupos carboxílicos livres do ácido galacturônico tenham sido parcialmente neutralizados por íons sódio, potássio, entre outros presentes no tampão, diminuindo os sítios para atuação da PG (Kashiap et al., 2001).

A atividade enzimática da PG extraída do albedo homogeneizado e tratado com tampões de pH 4, 5, 6, 8 e 9 não apresentou diferenças significativas a  $p < 0,05$ , segundo o teste de Scott-Knott. Pelo que se percebe, a estrutura celular que envolve a enzima não deixou com que ocorressem variações tão intensas, não afetando assim, a configuração iônica dos radicais de aminoácidos envolvidos direta ou indiretamente com o centro ativo da enzima (Azevedo et al., 2003).



Tabela 2. Atividade enzimática da PG encontrada após o albedo homogeneizado passar por tratamento em suspensão de tampão com diferentes valores de pH, por 1 hora à temperatura ambiente. O controle foi mantido em suspensão de água destilada.

Tratamentos	<sup>1</sup> Média (U.mL <sup>-1</sup> )	Desvio padrão
Controle	1,87 <sup>A</sup>	0,11
pH 10	1,60 <sup>B</sup>	0,08
pH 7	1,50 <sup>B</sup>	0,06
pH 8	1,31 <sup>C</sup>	0,06
pH 5	1,31 <sup>C</sup>	0,08
pH 4	1,24 <sup>C</sup>	0,05
pH 9	1,21 <sup>C</sup>	0,03
pH 6	1,21 <sup>C</sup>	0,07

<sup>1</sup>Médias de 3 repetições e respectivas letras do agrupamento de Scott-Knott. Médias com letras iguais verticalmente não diferem significativamente a  $p < 0,05$ .

4.4. Experimento III: Determinação das condições de tratamento com Ca<sup>2+</sup> visando à inativação enzimática da PG presente no albedo homogeneizado

O Cálcio tem recebido muita atenção por fazer parte da parede celular e lamela média dos vegetais. A sua utilização em tratamentos pós-colheita tem garantido a manutenção da textura dos tecidos vegetais, devido a uma menor solubilização de pectinas (Silveira et al., 2011; Barbagallo et al., 2012).

A fim de avaliar o efeito do tratamento com Ca<sup>2+</sup> para a inativação da PG, além da caracterização inicial (albedo homogeneizado que não ficou em agitação por 1 hora), também foi utilizado um tratamento controle, o qual ficou em agitação constante por 1 hora em temperatura ambiente. Foi possível constatar um aumento da atividade enzimática do tratamento controle ( $p < 0,05$ ) em relação à caracterização inicial do albedo homogeneizado (Figura 15). Silveira et al. (2011), ao tratar melão minimamente processado com sais de Ca<sup>2+</sup>, também obtiveram uma atividade de PG mais elevada no tratamento controle em referência aos frutos utilizados para caracterização inicial, e explicaram que poderia ser devido ao estresse induzido pelas operações de corte e tempo em que o material permaneceu sem qualquer tratamento que pudesse prevenir a atuação da PG.

A redução na atividade enzimática de PG após os tratamentos químicos contendo 0,01% e 1% de Ca<sup>2+</sup> foi de 58,02 e 96,15%, respectivamente, em

comparação aos valores iniciais antes do tratamento. As medidas em relação ao controle apresentaram uma redução de 71,61% e 97,39% para os tratamentos com Ca a 0,01% e 1%, respectivamente. É possível observar que, quanto maior a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizada nos tratamentos, maior é a inibição da enzima PG no material homogeneizado do albedo da casca do maracujá. Alonso et al. (1995) também obtiveram menores níveis de atividade enzimática em cerejas tratadas com cálcio em comparação aos frutos controle, sendo que na concentração de 1% houve efeito inibitório sobre a atividade da enzima.

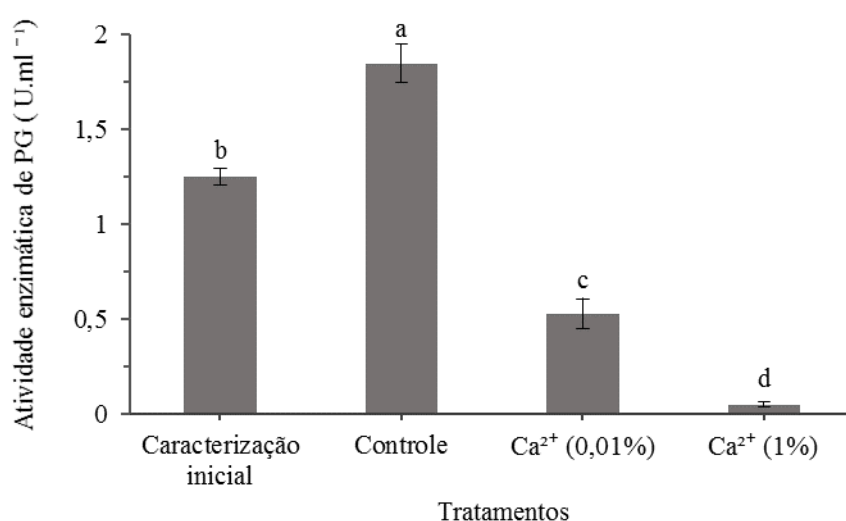


Figura 15. Atividade enzimática da PG encontrada após o albedo homogeneizado passar por tratamento em suspensão em diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ , por 1 hora à temperatura ambiente. Caracterização inicial (albedo homogeneizado e atividade avaliada imediatamente), Controle (albedo homogeneizado e agitado durante 1 hora à temperatura ambiente). Médias de 5 repetições para cada tratamento.

A enzima PG atua mais intensamente em ácidos carboxílicos livres da pectina. A inibição da atividade enzimática da PG, após o tratamento com  $\text{Ca}^{2+}$  no albedo homogeneizado, pode ser atribuída ao fato de que, o  $\text{Ca}^{2+}$  pode ter ligado aos grupos carboxílicos livres na molécula de pectina, estabilizando a estrutura da parede celular por formar pectato de cálcio, o que aumenta a rigidez da parede celular e restringe a ação da PG (Abeles e Takeda, 1989; Silveira et al., 2011; Alandes et al., 2009).

Os benefícios do tratamento com  $\text{Ca}^{2+}$  também foram reportados por Camargo et al. (2000) que determinaram o efeito do  $\text{CaCl}_2$  sobre a atividade

enzimática de PG e PME em morangos (*Fragaria ananassa Duch.*). A atividade da PG foi maior nos frutos controle em relação aos tratados com 2 e 4% de  $\text{CaCl}_2$ . Esses resultados reforçam que a presença de íons de  $\text{Ca}^{2+}$ , pode ter dificultado o acesso da PG às cadeias de ácido poligalacturônico, inibindo a solubilização das pectinas.

Baixas atividades de PG também foram encontradas em frutos de mamoeiro que passaram por submersão em  $\text{CaCl}_2$  a 2% e posteriormente foram armazenados por 35 dias a  $10^\circ\text{C}$  e 85% de umidade relativa em embalagem de filme PVC (Bicalho et al., 2000).

Moraes (2011) avaliou o efeito da aplicação dos íons de  $\text{Ca}^{2+}$  na conservação de caqui 'Giombo', visando à manutenção da qualidade e retardo do amadurecimento. Os frutos foram imersos por 10 minutos nas seguintes concentrações de  $\text{CaCl}_2$ : 0 (controle), 1, 2 e 3 %. Posteriormente, foram embalados com filme de policloreto de vinila 0,020mm e armazenados à temperatura de  $0\pm 0,5^\circ\text{C}$  e  $85\pm 5\%$  UR por 35 dias. Amostras foram analisadas a cada 7 dias de armazenamento. Os menores valores enzimáticos de PG ao final do armazenamento e média geral dos dias foram para a concentração de 1% de  $\text{CaCl}_2$ .

Conway et al. (1992) citam que as pontes de  $\text{Ca}^{2+}$  são resistentes não apenas às enzimas hidrolíticas dos tecidos vegetais, como também às enzimas produzidas por fungos e bactérias, induzindo a resistência dos tecidos aos mesmos.

Diante do exposto, pode-se observar que objetivo básico dos tratamentos com íons de  $\text{Ca}^{2+}$  no processamento de alimentos é inibir a atividade de enzimas, retardando as mudanças químicas e físicas que podem afetar de forma negativa a qualidade das frutas ou de seus subprodutos, podendo ser armazenados em condições de consumo ou de processamento por períodos maiores do que geralmente seria possível por outros meios.

#### 4.5. Experimento IV: Grau de esterificação da pectina extraída do albedo homogeneizado e tratado em diferentes concentrações de $\text{Ca}^{2+}$

De acordo com a Tabela 3, é possível observar um decréscimo no grau de esterificação (GE) das pectinas extraídas do albedo homogeneizado e tratado com  $\text{Ca}^{2+}$  ( $p < 0,05$ ). Segundo Bem-Arie e Sonogo (1980), a redução do GE quando se adiciona  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser explicado devido ao  $\text{Ca}^{2+}$  modular, a estrutura e as propriedades da rede de pectinas. Quando altos níveis deste íon se acumulam no apoplasto, ocorrem ligações cruzadas de cálcio com a pectina. Assim, ocorre uma forte inibição da liberação das pectinas da parede celular e também suprime a atividade da PG (Rose, 2003; Clare et al., 2015).

Tabela 3. Grau de Esterificação (GE) da pectina extraída do albedo homogeneizado e tratado com diferentes concentrações de Ca em temperatura ambiente.

Concentrações <sup>1</sup>	Intervalos de tempos (horas)					
	0	$\sigma$	12	$\sigma$	24	$\sigma$
0 %	43.37aA	0.2	42.57aA	0.5	43,65aA	1,1
0,01%	24.46bA	0.1	14.53bB	0.3	16.00bB	0,1
1%	15.14cA	0.7	15.44bA	1.3	08,97cB	0,4

<sup>1</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Analisando os dados de ácidos carboxílicos livres (ACL) mostrados na Tabela 4, nota-se a manutenção dos valores nas primeiras 12 horas e um aumento de ACL no tempo de 24 horas no material do tratamento controle que não foi adicionado de  $\text{Ca}^{2+}$ . Desta forma, sugere-se que pode estar havendo ação das enzimas PG que promove a hidrólise ácidos galacturônicos.

A adição de  $\text{Ca}^{2+}$  a 0,01% provoca uma pequena redução do conteúdo de ACL no tempo inicial, quando comparado como controle, mas o incremento do conteúdo de ACL é mais acentuado no intervalo de 12 a 24 horas, sugerindo que essa concentração tenha estimulado a degradação da pectina. Thibault et al., (1991) e Canteri et al., (2012) afirmaram que pode ocorrer degradação da pectina por  $\beta$ -eliminação, reação que pode ocorrer quando há aumento da concentração

de álcali e da temperatura ou na presença de íons tais como o  $\text{Ca}^{2+}$  que não estejam na concentração adequada.

O tratamento com  $\text{Ca}^{2+}$  a 1% promoveu uma redução acentuada de ACL no tempo inicial, quando comparado com o controle, permanecendo valores baixos no intervalo de 12 horas, podendo ser atribuído ao efeito da ligação dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  com os grupamentos carboxílicos livres da pectina. No entanto, após 24 horas de manutenção do material em temperatura ambiente ocorreu aumento dos valores de ACL, indicando a ocorrência de hidrólise da pectina, mas os valores permaneceram muito inferiores àqueles obtidos do tratamento controle (Tabela 3).

Tabela 4. Conteúdo de Ácidos Carboxílicos Livres (%) da pectina extraída de albedo do maracujá homogeneizado e tratado com diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  e mantido em temperatura ambiente.

Concentrações <sup>1</sup>	Intervalos de tempos (horas)					
	0	$\sigma$	12	$\sigma$	24	$\sigma$
0 %	14,36aB	0,25	13.92aB	0,61	16.93bA	0,13
0,01%	12,45bC	1,43	15.48aB	1,07	22.87aA	2,17
1%	5,32cB	0,62	6.4bB	1.15	11.56cA	0.72

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Analisando os dados de ácidos carboxílicos esterificados (ACE) para o tratamento controle, mostrados na Tabela 5, nota-se que o conteúdo permanece mais alto e constante no intervalo de 12 horas, ocorrendo um incremento mínimo, após 24 horas de manutenção do material em temperatura ambiente.

O tratamento com  $\text{Ca}^{2+}$  promoveu uma redução drástica no conteúdo de ACE, sendo o efeito mais acentuado na concentração de 1%  $\text{Ca}^{2+}$ . Além disso, nota-se que o seu conteúdo não alterou ao final de 24 horas de manutenção do material em temperatura ambiente. A redução do conteúdo de ACE em função do tratamento com íons de  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser atribuída ao efeito de bloqueio da molécula de pectina devido à formação do pectato de cálcio.

Tabela 5. Conteúdo de Ácidos Carboxílicos Esterificados (%) da pectina extraída de albedo do maracujá homogeneizado e tratado com diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  e mantido em temperatura ambiente.

Concentrações <sup>1</sup>	Intervalos de tempos (horas)					
	0	$\sigma$	12	$\sigma$	24	$\sigma$
0 %	11,03aB	0,28	10,97aB	0,47	13,36aA	0,27
0,01%	4,01bA	0,43	2,34bB	0,14	4,12bA	0,21
1%	0,94cA	0,06	1,20cA	0,11	1.13cA	0.13

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## CONCLUSÕES

A concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  de 0,01% na solução de suspensão do albedo homogeneizado do maracujá influenciou, significativamente, reduzindo a atividade da enzima PG. Analisando os dados ACL, a concentração de 0,01% estimulou a degradação da pectina no intervalo de 12 e 24 horas. Já a concentração de 1% inibiu drasticamente a atividade da enzima PG e, ainda, promoveu uma redução acentuada de ACL no tempo inicial e permanecendo valores baixos no intervalo de 12 horas, demonstrando ser mais eficaz a concentração de 1% de  $\text{Ca}^{2+}$ .

O tratamento térmico (90°C por 4 horas) diretamente no albedo homogeneizado mantido em suspensão reduziu a atividade enzimática de PG, em 50%. Já a inativação em extrato bruto obteve-se sucesso, com inativação da enzima após incubação nas temperaturas de 65, 75 e 85°C por 30, 20 e 10 minutos, respectivamente.

Com relação ao tratamento de mudança do pH do albedo homogeneizado, houve uma ligeira redução da atividade enzimática da PG quando se compara ao tratamento controle (pH 6 sem adição de tampão) do tratamento em pH 6 (tampão fosfato de sódio), sugerindo que os grupos carboxílicos livres do ácido galacturônico tenham sido parcialmente neutralizados

por íons sódio, potássio, entre outros presentes no tampão, diminuindo os sítios para atuação da PG.

Para futuras pesquisas, é válida uma determinação minuciosa das modificações dos componentes celulares do albedo tratado com  $\text{Ca}^{2+}$ , como por exemplo, determinação do  $\text{Ca}^{2+}$  ligado, conteúdo de ácidos urônicos e outras análises que possam comprovar o benefício de se tratar o albedo, para obtenção de uma pectina de qualidade reológica elevada, favorecendo a relação custo/benefício no balanço final para obtenção de uma farinha de maracujá padronizada que visa assegurar aos consumidores um produto de melhor qualidade.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeles, F.B., Takeda, F. (1989) Increased cellulase activity during blackberry fruit ripening. *HortScience*, 24:851-859.
- Aina, J.O., Oladunjoye, O.O. (1993) Respiration, pectolytic activity and textural changes in ripening African mango (*Irvingia gabonensis*) fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 63:451-454.
- Alandes, L., Pérez-Munuera, I., Llorca, E., Quiles, A., Hernando, I. (2009) Use of calcium lactate to improve structure of “Flor de Invierno” fresh-cut pears. *Postharvest Biology and Technology*, 53:145-151.
- Almeida, D.F., Huber, D.J. (2007) Polygalacturonase-mediated dissolution and depolymerization of pectins in solutions mimicking the pH and mineral composition of tomato fruit apoplast. *Plant Science*, 172:1087–1094.
- Alonso, J., Rodriguez, T., Canet, W. (1995) Effect of calcium pretreatments on the texture of frozen cherries. Role of pectinesterase in the changes in the pectin materials. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 43:1001-1006.
- Alvim, K., Clemente, E. (1998) Estudo da termoestabilidade de peroxidase extraídas da polpa e casca de mexerica (*Citrus deliciosa*). *Acta Scientiarum*, 2:201-204.
- Arthey, D., Dennis, C. (1991) Vegetable Processing. *John Wiley e Sons*. 280 p.

- Azevedo, M.O. (Org.) (2003) *Técnicas básicas em biologia molecular*. Brasília: UNB, 211p.
- Barbagallo, R.N.(2012) Effects of calcium citrate and ascorbate as inhibitors of browning and softening in minimally processed 'Birgah' eggplants. *Postharvest Biology and Technology*, 73:107-114.
- Barboza, R.A., Uehara, K.S., Canteri, M.H.V., Beninca, C. (2012) Utilização de pectina extraída de resíduos de maracujá (*passiflora edulis*) em substituição parcial de gordura como agente estabilizante em sorvete. *XVII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná*, Ponta Grossa.
- Bem-Arie, R., Sonogo, L. (1980) Pectolytic enzyme activity involve woolly breakdown of stored peaches. *Phytochemistry*, 19:2453-2555.
- Bernacci, L.C., Soares-Scott, M.D., Junqueira, N.T.V., Passos, I.R.S., Meletti, L. M.M. (2008) *Passiflora edulis* Sims: The correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30(2): 566-576.
- Bicalho, U.O., Chitarra, M.I.F., Coelho, A.H. (2000) Modificações texturais em mamões submetidos à aplicação pós-colheita e embalagem de PVC. *Ciência e Agrotecnologia*, 24:136-146.
- Bochek, A. M., Zabivalova, N. M., Petropavlosvskii, G. A. (2001) Determination of the esterification degree of polygalacturonic acid. *Journal of Applied Chemistry*, 74:775-777.
- Buggenhout, S.V., Sila, D.N., Duvetter, T., Loey, V., Hendrickx, M. (2009) Pectin in Processed Fruits and Vegetables: Part III-Texture Engineering. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8: 105-117.
- Camargo, Y.R., Lima, I.C.de, Scalon, S.P.Q., Siqueira,A.C. (2000) Efeito do cálcio sobre o amadurecimento de morangos (*fragaria ananassa duch.*) *Ciência e Agrotecnologia*, 24:968-972.
- Canteri, M.H.G., Scheer, A.P., Ginies, C., Marie-Genevieve, C., Wosiachi, G. (2010) Importance of thermal treatment on the rind passion fruit to pectin extraction. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 4: 109-121.
- Canteri, M.H.G., Wosiacki,L.M.G., Scheer, A. de P. (2012) Pectina: da matéria-prima ao produto final. *Polímeros*, 2:149-157.

- Castro, P.R.C., Kluge, R.A. (1998) Ecofisiologia de fruteira tropicais: abacaxizeiro, maracujazeiro, mangueira, bananeira e cacauzeiro. 1:111.
- Chitarra, M.I.F., Chitarra, A.B. (2005) *Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio*. 2. ed. Lavras: UFLA.
- Clare, K., Katleen, L.D.D.W., Stefanie C., Ann M. Van Loey,, Marc, E.H. (2015) Microscopic evidence for Ca<sup>2+</sup> mediated pectin–pectin interactions in carrot-based suspensions. *Food Chemistry*, 188:126-136.
- Conway, W.S., Sams, C.E., Guire, R.G., Kelman, A. (1992) Calcium treatment of apples and potatoes to reduce postharvest decay. *Plant Disease*, 72:329-334.
- Corrêa, A.D. (2005) Fibras na prevenção de doenças. Textos acadêmicos, Universidade Federal de Lavras. Lavras: FAEPE, 43 p.
- Cruz, C.D. (2001) *Programa genes*: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV.
- Cunha, G. M. A. (2005). Estudo da cinética de inativação térmica da peroxidase presente na polpa de goiaba. In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica.
- D'addosio, R.D., Páez, G., Marín, M., Mármol Z., Ferrer, J. (2005) Obtención y caracterización de pectina a partir de la cáscara de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 22: 241-251.
- Damodaran, S., Parkin, K.L., Fennema, O.R. (2010) *Química de Alimentos de Fennema*. Porto Alegre: Artmed, 900 p.
- Derivi, S.C.N., Mendez, M.H.M. (1982) Ação do pectato de cálcio da pectina cítrica sobre os níveis de colesterol sérico e fecal, em coelhos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 4:57-66.
- Deytieux-belleau, C., Vallet, A., Donèche, B., Geny, L. (2008) Pectin methylesterase and polygalacturonase in developing grape skin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46: 638-646.
- Duvetter, T., Sila, D.N., Buggenhout, S.V., Jolei, R., Van, L.A., Hendrickx, M. (2009) Pectin in processed fruit and vegetables: Part I-Stability and catalytic activity of pectinases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8:75-85.

- Fellows, P.J. (2006) *Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática*. 2 ed. Porto alegre: Artmed, 602p.
- Fertonani, H.C. R., Scabio, A., Carneiro, E.B.B., Canteri-Schemin, M.H., Nogueira, A., Wosiacki, G (2009). Extraction Model Of Low Methoxyl Pectin from Apple Pomace Effects of acid concentration and time on the process and the product. *Brazilian archives of biology and technology*, 52:177-185.
- Food Ingredients Brasil (2011). Enzimas: Natureza e ação nos alimentos. *FIB*, 16: 26-37.
- IBRAF (Instituto Brasileiro de Frutas) (2013) Panorama da Cadeia Produtiva das frutas em 2012 e projeções para 2013. 127 p.
- Kashiap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., Tewari, R.(2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology, London*, 77: 215-227.
- Kertes, Z.I. (1951) The pectic substances. New York: Interscience, 628 p.
- Lima, M.A.C. (2002) Alterações bioquímicas e fisiológicas durante a maturação e o armazenamento de graviola sob refrigeração associada a 1-metilciclopropeno e cera. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará. 208p.
- Marschner, H.(1995) *Mineral nutrition of higher plants*. London: Academic.
- Matsuura, F.C.A.U. (2005) *Estudo do albedo de maracujá e de seu aproveitamento em barra de cereais*. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos- Área de Tecnologia de Alimentos)- Campinas- SP, Universidade Estadual de Campinas, 138 p.
- Medeiros, J. S., Diniz, M. F. F. M., Sabaa-Srur, A. U. O., Pessoa, M. B., Cardoso, M. A. A., Carvalho, D. F. (2009) Ensaios toxicológicos clínicos da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*), como alimento com propriedade de saúde. *Revista Brasileira de Farmacologia*, 19: 394-399p.
- Miller, G.L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v:426-428.
- Ministério da Integração Nacional ( 2004). Cadernos Frutiséries. Disponível em <[http://www.irrigar.org.br/publicacoes/frutiserias/frutiserias\\_2\\_df.pdf](http://www.irrigar.org.br/publicacoes/frutiserias/frutiserias_2_df.pdf)>. Acesso em: 10/03/2014.

- Moraes, M.R., Vieites, R.L., Daiuto, E.R., Picanço, N.F.M. (2011) Firmeza de caqui 'Giombo' submetido à aplicação pós-colheita de cloreto de cálcio. *Revista Brasileira de Fruticultura*,E:321-327.
- Mota, W.F., Salomão, L.C.C, Pereira, M.C.T.P; Cecon, P.R.(2002) Influência do tratamento pós-colheita com  $\text{Ca}^{2+}$  na conservação de jabuticabas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24:
- Nishina, P.M., Schneeman, B.O., Freedland, R.A. (1991) Effects of dietary fibers on nonfasting plasma lipoprotein and apolipoprotein levels in rats. *Journal Nutri*, 121:431-437.
- Oliveira, A.C.(2013) Estudo da produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando resíduo agroindustrial de Manga (*Mangífera indica L.*). Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Itapetinga-Ba,Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-UESB,60 p.
- Oliveira, E. M. S.(2009) Caracterização de rendimento das sementes e do albedo do maracujá para aproveitamento industrial e obtenção da farinha da casca e pectina. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)- Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF, 400p.
- Paiva, E.P., Lima, M.S., Paixão, J.A. (2009) Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. *Revista Iberoamericana de Polímero*, 10:196-211.
- Parkin, K.L. (2010) Enzimas. In: Fennema, O. R. *Química de los Alimentos*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, p 264-316.
- Pereda, J.A.O., Rodrigues, M.I.C., Álvarez, L.F., Sanz, M.L.G., Minguillón, G.D.G.F., Perales, L.H., Cortecero, M.D.S. (2005) *Tecnología de alimentos – Componentes e processos*, Porto Alegre: Artmed.
- Peres, P.A., Canteri, M.H. (2005) Rendimento da extração de pectina de diferentes partes de maracujá. *XI Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos*. Campinas, 1467p.
- Pomeranz, Y., Melon,C.E. (2000) *Food Analysis: Theory and Practice*. 3 ed. An aspen publication,778p.
- Prasath, R.A., Gokmen, M.T., Espeel, P., Prez, F.( 2010) Thiol-Ene and Thiol-Yne Chemistry in Microfluidics: A Straightforward Method towards Macroporous

- and Nonporous Functional Polymer Beads. *Polymer Chemistry*, 1:685-692.
- Pressey, R., Avants, J.K. (1973a) Separation and characterization of endopolygalacturonase and exopolygalacturonase from peaches. *Plant Physiology*, 52:252-256.
- Pressey, R., Avants, J.K. (1973b) Two forms of polygalacturonase in tomatoes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 309:363–369.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. (1996) *Biologia Vegetal*. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 738 p.
- Reolon, C.A., Braga, G.C., Salibe, A.B., Vial, M.S. (2008) Composição físico-química e mineral da casca do maracujá em diferentes estádios de maturação. *Congresso Brasileiro de Fruticultura e 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture*, Vitória.
- Rodrigo, D. , Cortes, C. , Clynen, E., Schoofs, L., Van Loey, A., Hendrickx, M. (2006) Thermal and high-pressure stability of purified polygalacturonase and pectinmethylesterase from four different tomato processing varieties. *Food Research International*, 2:440-448.
- Roehring, K. (1988) The physiological effects of dietary fiber. *Food Hydrocolloids*, 2:1-18.
- Ros, J.M., Saura, D., Coll, L., Laencina, J.(1992) Métodos analíticos avanzados para la determinación de sustancias pécticas y actividades enzimáticas pectolíticas. *Alimentación equipos y tecnología*. p. 149-155.
- Rose, J.K.C. (2003) *The plant Cell Wall*. Garsington: Blackwell Publishing, 381p.
- Scabio, A., Fertonani, H. C. R., Canteri-Schemin, M. H., Petkowicz, C. L. O., Carneiro, E. B. B., Nogueira, A., Wosiacki, G.(2007). A model for pectin extraction from apple pomace. *Brazilian Journal of Food Technology*, 259-265.
- Scalon, S.P.Q. (1999) Efeitos da aplicação de cloreto de cálcio em morango. *Revista Brasileria de Fruticultura*, 21:156-159.
- Schneeman, B.O. (1986) Dietary fiber: physical and chemical properties, methods of analysis, and physiological effects. *Food Technology*, 40:104-110.
- Silva, H.R.F., Resende, E.D., Pinto, L.K.A., Almeida, R.F., Martins, M.L.L. (2006) Atividade da enzima poligalacturonase em frutos de mamoeiro cv. Golden

- armazenados sob refrigeração. *Revista Brasileira de Armazenamento*, 31: 187-191.
- Silva, T.V., Resende, E.D., Viana, A.P., Rosa, R.C.C., Pereira, S.M.F., Carlos, L.A., Vitorazi, L. (2008). Determinação da escala de coloração da casca e do rendimento em suco do maracujá-amarelo em diferentes épocas de colheita. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30:880-884.
- Silveira, A.C., Aguayo, E., Chisari, M., Artés, F. (2011) Calcium salts and heat treatment for quality retention of fresh-cut 'Galia' melon. *Postharvest Biology and Technology*, 62:77-84.
- Singh, P., Dwivedi, U.N. (2008) Purification and characterization of multiple forms of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* cv. *Dashehari*) fruit. *Food Chemistry*, 111:345–349.
- Souza, V.C., Lorenzi, H. (2005) *Botânica Sistemática*. São Paulo: Instituto Plantarum, 640 p.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2009) *Fisiologia vegetal*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 819p.
- Thibault, J. F., Saulnier, L., Axelos, M.A.V., Renard, C.M.G.C.(1991) - Bull. Soc. Bot. Fr., 314:319.
- Vilas Boas, E.V. (2010) *Alimentos e nutrientes. Textos acadêmicos Universidade Federal de Lavras*. Lavras: FAEPE, 75 p.
- Wakabayashi, K., Huber, D.J. (2001) Purification and catalytic properties of polygalacturonase isoforms from ripe avocado (*Persea americana*) fruit mesocarp. *Physiologia Plantarum*, 113:210–216.
- Willats, W.G.T, Knox, J.P., Mikkelsen, J. D. (2006) Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17:97-104.
- Wong, D. W. S.(1995) *Química de los Alimentos: mecanismos y teoría*. Zaragoza: Acribia, 476 p.
- Yapo, B.M., Koffi, K.L. (2006) Yellow passion fruit rind a potencial source of low-methoxyl pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 2738-2744.