Protocolo de Extração da Pectinametilesterase do Albedo de Maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)

REVISTA ELETRÔNICA MULTIDISCIPLINAR
UNIFACEAR

Adeline Chaicouski[1]; Maria Helene Giovanetti Canteri[2]

[1] *Universidade Estadual de Ponta Grossa;* [2] *Universidade Tecnológica Federal do Paraná*

RESUMO

A pectina é formada basicamente por unidades de ácido galacturônico, parcialmente esterificadas com grupos metoxílicos, classificada em alto (ATM) ou baixo (BTM) grau de metoxilação. A pectina sofre ação das pectinases, enzimas pécticas ou enzimas pectinolíticas, responsáveis por reações de despolimerização ou de desesterificação. A enzima pectinametilesterase-PME desesterifica a pectina ATM, tornando-a de BTM ou ácido péctico. A atividade da PME varia entre frutos durante o amadurecimento, aumentando, diminuindo ou permanecendo constante. O maracujá-amarelo é um fruto cuja vida pós-colheita é curta, devido ao aumento na taxa respiratória e produção de etileno, com diversas alterações durante o amadurecimento, como a degradação de pectina, alteração da coloração da casca e na composição química. Uma das utilizações do albedo é a produção de farinha, adicionada a outros alimentos. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de extração da PME do albedo de maracujá-amarelo, por meio de cinco métodos diferentes de extração. A partir dos resultados obtidos, foi possível detectar a atividade enzimática correspondente à PME na amostra analisada. Em relação ao grau de maturação, a maior atividade foi na amostra verde. A amostra liofilizada apresentou maior atividade enzimática que a fresca, e dos métodos analisados, todos influenciaram na atividade enzimática, com diferenças pequenas ou inexistentes em nível estatístico.

Palavras chave: Maracujá amarelo; Albedo; Atividade enzimática; Pectinametilesterase; Extração enzimática.

ABSTRACT

Pectin is basically formed by units of galacturonic acid, partially esterified with methoxy groups, classified as high (ATM) or low (BTM) degree of methoxylation. Pectin undergoes the action of pectinases, pectic enzymes or pectinolytic enzymes, responsible for depolymerization or deesterification reactions. The enzyme pectinamethylesterase-PME de-esterifies ATM pectin, making it BTM or pectic acid. The SME activity varies between fruits during ripening, increasing, decreasing or remaining constant. Yellow passion fruit is a fruit whose post-harvest life is short, due to the increase in respiratory rate and ethylene production, with several changes during ripening, such as pectin degradation, changes in the color of the skin and chemical composition. One of the uses of albedo is the production of flour, added to other foods. The objective of this work was to establish an extraction protocol for the yellow passion fruit albedo PME, using five different extraction methods. From the results obtained, it was possible to detect the enzyme activity corresponding to the PME in the analyzed sample. Regarding the degree of maturation, the greatest activity was in the green sample. The lyophilized sample showed greater enzymatic activity than the fresh one, and of the analyzed methods, all influenced the enzymatic activity, with small or nonexistent differences in statistical level.

Key Words: Passion fruit; Albedo; Enzimatic activity; Enzimatic extraction.

1. INTRODUÇÃO

A estrutura da célula vegetal é formada pela presença de polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e proteínas, na parede celular vegetal, interligados à pectina**,** uma mistura de diferentes compostos, sendo o principal o ácido pectínico (KASHYAP *et al.,* 2001). A pectina é basicamente composta por unidades de ácido galacturônico unidas e parcialmente esterificadas com grupos metoxílicos, sendo classificada em alto ou baixo grau de metoxilação (AGM e BGM, respectivamente), de acordo com esses grupos carboxila, esterificados ou não com metanol (HUISMANN *et al*., 2004; VORAGEN *et al*., 2009). O grau de esterificação da pectina e a distribuição dos resíduos esterificados ao longo da cadeia muda de acordo com o ciclo de vida da planta (HERRON *et al*., 2000), sendo que os teores mais elevados se encontram em frutos cítricos, principalmente no albedo (BOBBIO e BOBBIO, 2001).

A pectina sofre ação das chamadas pectinases, enzimas pécticas ou enzimas pectinolíticas, responsáveis por reações de despolimerização (hidrolases e liases) ou de desesterificação (esterases) (ROMBOUTS e PILNIK, 1980). São necessárias enzimas que atuem em regiões diferentes da molécula devido às diferentes formas de pectina nas células vegetais (GUMMADI e PANDA, 2003). Basicamente há três tipos de pectinases: protopectinases, pouco abundantes e pouco interesse industrial; despolimerases e desmetoxilantes (deseterificantes ou esterases).

A enzima pectinametilesterase-PME (E.C. 3.1.1.11) desesterifica a pectina ATM, tornando-a de BTM ou ácido péctico. Durante a reação são formados carboxilatos livres (COO^-), metanol (CH_3OH) (ROMBOUTS e PILNIK, 1980) e íons hidrônio (H_3O^+) (JAYANI, SAXENA e GUPTA, 2005). O aparecimento de COO^- reduz o grau de esterificação aumentando a densidade de cargas negativas na cadeia de pectina. A atividade da PME varia de fruto para fruto durante o amadurecimento, aumentando, diminuindo ou permanecendo constante (FONTES *et al.,* 2009), ou ainda de acordo com a estação do ano (ŞİMŞEK, 2004). As técnicas mais utilizadas na determinação da atividade da PME são a titulação automática (KERTESZ, 1955), a medida da variação de pH (GONZALEZ e ROSSO, 2011), a determinação da concentração de metanol por cromatografia gasosa (CANTERI, 2010), além da medida por espectroscopia (HAGERMAN e AUSTIN, 1980).

O maracujá-amarelo é um fruto cuja vida pós-colheita é curta, devido ao aumento na taxa respiratória e produção de etileno, e passa por diversas alterações durante o amadurecimento, como a degradação de pectina, alteração da coloração da casca e na composição química (LIU *et al*., 2005; CHITARRA e CHITARRA, 2005). Como nos frutos cítricos, o pericarpo do maracujá é dividido em exocarpo ou flavedo e mesocarpo ou albedo (figura 1). A película interna ao redor das sementes é o endocarpo

ou arilo carnoso. A massa dos frutos varia entre 44 a 160 g distribuídas em uma forma ovalada de, em média, 6 a 8 cm de comprimento por 5 a 7 cm de largura (CABRAL, FREIRE JÚNIOR e DA MATTA, 2005).



FIGURA 1: FRUTOS DE MARACUJÁ-AMARELO (*Passiflora edulis f. Flavicarpa*).
FONTE: ADAPTADO DE EMBRAPA, 2012.

A principal utilização do albedo de maracujá é para produção de farinha (JANEBRO *et al.*, 2008), adicionada a outros alimentos. Como outros exemplos de reaproveitamento do albedo pode-se citar a produção de doce em massa (DIAS *et al.*, 2011), doce em calda (FIGUEIREDO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al..*, 2002) biscoito (ISHIMOTO *et al.*, 2007).

O objetivo deste trabalho foi determinar o melhor protocolo de extração para a PME do albedo de maracujá-amarelo em diferentes graus de maturação, em amostras frescas e liofilizadas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os frutos de maracujá-amarelo foram obtidos no comércio do município de Ponta Grossa (Altitude: -25.0945; Longitude: -50.1633, 25º5'40" Sul, 50º9'48" Oeste; Altitude: 956m; Clima subtropical úmido – Classificação de Köppen-Geiger: Cfa), Paraná, Brasil, selecionados em função das seguintes características: frutos firmes, isentos de defeitos e injúrias, com grau de maturação 2.

Os frutos de maracujá verde e amarelo selecionados foram processados imediatamente, após sua aquisição, nos laboratórios da Universidade Estadual de Ponta Grossa, laboratórios de Ciência e Tecnologia de Alimentos.



FIGURA 2: COLORAÇÃO DO FLAVEDO DAS AMOSTRAS DE MARACUJÁS UTILIZADAS (A-100% AMARELO E B-100% VERDE).

Os frutos foram lavados em água corrente e cortados, sendo a polpa separada do albedo e do flavedo, com determinação do teor de sólidos solúveis totais (ºBrix) da polpa em refratômetro de bancada ABBE de Projeção modelo WY1A®. As amostras foram separadas em dois grupos: frescas e liofilizadas. Parte dos frutos frescos foi separada para análise imediata da atividade enzimática. Outra porção das amostras foi instantaneamente congelada a -80 ºC, sendo parte dessa congelada em ultra-freezer liofilizadas por 48 horas em equipamento LD1500 Terroni® nas seguintes condições: vácuo inicial de 1335 µHg e final de 0,037 µHg, temperatura de -58 ºC (início 25/07/2013-12 h, término 31/07/2013-8h15 min). O material liofilizado foi armazenado em vidros hermeticamente fechados. Dessa maneira, foram produzidas quatro amostras para uso como matéria-prima para extração da PME: Verde fresca (VF), Maduro Fresca (MF), Verde Liofilizado (VL) e Maduro Liofilizado (ML).

Para as extrações, foram utilizados 30 g de material fresco (verde/maduro) e 3 g de material liofilizado (verde/maduro). Para o cálculo da atividade final de cada amostra e correção da diluição, os valores foram convertidos para padronização dos dados em 1,0 g de amostra, devido aos volumes e massas diferentes utilizados na extração da enzima. As filtrações foram realizadas em filtro de tecido (*cheesecloth*) em todas as etapas. Todos os extratos ao final do processo de extração foram submetidos à centrifugação em Centrífuga Hitachi High-Speed Refrigerated centrifuge Himac CR21GII e o sobrenadante final coletado foi denominado extrato enzimático.

Como substrato na determinação da atividade enzimática foi utilizada uma solução de pectina 1,0% (CP Kelco-AGM), hidróxido de sódio 0,01 N, livre de CO_2, para ajuste de pH e cloreto de sódio para manter a força iônica da solução de pectina e extrair a PME da parede celular. Os demais reagentes estão citados em cada uma das

metodologias de extração utilizadas. Todas as soluções foram preparadas com água do Ultra Purificador de Água GEHAKA (Labstore/Master System).

Foram testadas cinco metodologias diferentes, baseadas em trabalhos com fontes vegetais diversas, como a berinjela (CARDELLO e LOURENÇO, 1992), cascas de laranja (ŞIMŞEK, 2004), bananas (LY-NYGUEN *et al.*, 2002), maçãs (DENE'S, BARON e DRILLEAU, 2002) e mamão (PINTO, 2009).

Na metodologia 1, as amostras de maracujá (verde/maduro) foram homogeneizadas em mixer Black&Decker, por aproximadamente 1 minuto, em solução tampão fosfato de sódio 5 mmol L^{-1}, pH 7.5, contendo E.D.T.A. 20 mmol L_{-1} (quelante de íons, principalmente o Ca^{+2}), metabissulfito de sódio ($Na_2S_2O_5$) 10 mM como antioxidante, para inibir a ação dos compostos fenólicos presentes, cloreto de sódio (NaCl) 0,6 mol L^{-1} e 2-mercaptoetanol 5 mmol L^{-1}, na proporção 1:5 (m:v). As soluções utilizadas em todas as extrações estavam refrigerada para evitar aquecimento durante a homogeneização. A suspensão foi mantida sob agitação lenta por 1 hora em banho de gelo, seguido de filtração. O filtrado foi aquecido a 50 ºC por 1 hora para precipitação da pectina solúvel, sendo em seguida resfriado em banho de gelo e centrifugado a 15000 g por 60 minutos a 4 ºC, sendo o sobrenadante coletado (CARDELLO e LOURENÇO, 1992).

Na metodologia 2, utilizou-se apenas água ultra-pura gelada, homogeneizada com a amostra de maracujá (verde/maduro) em mixer Black&Decker, filtrado e ressuspendido em água ultra-pura gelada. Esse procedimento foi repetido duas vezes. O filtrado foi pesado (aproximadamente 30 g) e o valor da massa completado com solução de NaCl 1,0 mol L^{-1} para 100 g. Este material foi agitado por 30 minutos para a extração da enzima, novamente filtrado e o sobrenadante centrifugado a 5000 g por 20 minutos, sendo o pellet descartado. O sobrenadante foi coletado. De acordo com Şimşek (2004) esta extração evita a formação de gel durante o procedimento.

Na metodologia 3, adaptada dos trabalhos de Ly-Nguyen *et al.* (2002) com bananas, a amostra foi homogeneizada em mixer Black&Decker com água ultra-pura gelada, para retirada de uma grande fração de pectina. Porém, a enzima permanece associada a parede celular. Para sua solubilização utilizou-se um tampão levemente alcalino com adição de NaCl 1,0 mol L^{-1} (1:1), que também solubiliza quantidades variáveis de pectina adicionais. As amostras (verde/maduro) foram lavadas com água ultra-pura gelada, seguidas de centrifugação a 15000g por 30 minutos a 4 ºC, com sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspendido em água ultra-pura gelada e novamente centrifugado na mesma condição anterior para remoção das substâncias pécticas. O material foi misturado em tampão Tris-HCl 0,2 mol L^{-1} com NaCl 1,0 mol L^{-1},

em pH 8 (1:1), durante a noite. Após a extração a suspensão foi centrifugada a 15000g por 60 minutos e o pellet descartado, o sobrenadante coletado.

A metodologia 4 foi baseada no trabalho de Dene's, Baron e Drilleau (2000) com maçãs. A extração foi realizada de forma a evitar a perda de atividade pela inibição dos fenólicos e solubilizar a PME da parede celular. A amostra foi homogeneizada em mixer Black&Decker com água ultra-pura gelada contendo 500 mg L^{-1} de sulfito de sódio. O material foi centrifugado a 15000g por 30 minutos a 4 ºC e o pellet foi ressupendido em de água ultra-pura gelada contendo 500 mg L^{-1} de sulfito de sódio e centrifugada novamente. Isto ajudou a eliminar cerca de 88% de proteínas, fenólicos solúveis em água, açucares e pectinas solúveis. O pellet foi ressupendido em tampão com 20 mmol L^{-1} Tris-HCl (pH 7.5) e NaCl 1,0 mol L^{-1} contendo 500 mg L^{-1} de sulfito de sódio, seguido por centrifugação 15000g por 30 minutos a 4 ºC. O sobrenadante foi homogeneizado com 1,0% (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP) insolúvel por 30 minutos e centrifugado 15000 g por 30 minutos a 4 ºC. O tratamento com PVPP foi repetido três vezes. O último sobrenadante foi coletado.

A metodologia 5 foi baseada nos ensaios de Pinto (2009) que trabalhou com mamão. Nesta extração as amostras foram homogeneizadas em mixer Black&Decker com uma solução de NaCl 1,0 mol L^{-1}, pH 7,5 contendo 1,0% (m/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP) insolúvel. Essa solução foi centrifugada a 15000 g durante 30 minutos a 4 ºC, e o sobrenadante (extrato enzimático) utilizado para a dosagem da atividade da enzima.

A determinação da atividade enzimática foi realizada pelo método espectrométrico descrito por Hargemann e Austin (1986), com uso do indicador azul de bromotimol (*pKa* 6,0) para a observação da reação enzima-substrato, e consequentemente diminuindo o pH do meio, devido a exposição dos grupos carboxílicos. O substrato constituiu-se de uma solução de pectina cítrica 10 g L^{-1}, diluída em solução de NaCl 1,0 mol L^{-1} preparada em água ultra-pura com aquecimento e sob agitação constante, e o ajuste do pH, para 7,5, foi realizado com NaOH 0,01 N, livre de CO_2. As medidas de pH foram realizadas em pHmetro PHS-3B-Labmeter model pH 2.

Em cubeta com caminho ótico de 1,0 cm, foram misturados 2,0 mL de solução de pectina com 150 µL de azul de bromotimol (0,04%) preparado em solução tampão fosfato de potássio 3 mmol L^{-1}. Em seguida, 800 µL de extrato enzimático foram adicionados e o decréscimo da absorbância a 620 nm foi monitorado por 2 minutos, com leituras a intervalos de 5 segundos em espectrofotômetro Spectrum/ VisSpectrophotometer SP-1105. A atividade da PME de 1U (uma unidade) foi definida

como um decréscimo de 0,1 na absorbância por minuto (JAKÓB *et al.,* 2009). As leituras das absorbâncias foram realizas em temperatura ambiente (±25ºC).

A atividade enzimática foi monitorada após cada etapa dos ensaios. Todas as análises foram realizadas a baixas temperaturas, para evitar a inativação da enzima, os reagentes utilizados eram de grau analítico, e as análises realizadas em triplicatas e expressas como média e desvio padrão, e analisadas estatisticamente pelo teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho notou-se que a forma de extração da enzima da sua matriz natural, o maracujá, pode dificultar os trabalhos posteriores com esta enzima, uma vez que, se não retirada a pectina do meio, ocorre formação de um gel estável quando a temperatura é reduzida. Desta forma, a melhor maneira de se evitar a formação deste gel é a lavagem sucessiva do material do qual será feita a extração com água gelada e depois uma homogeneização com sal para retirar a enzima da parede celular (ŞIMŞEK, 2004).

Na tabela 1 encontram-se os valores médios dos sólidos solúveis totais das polpas de maracujá em estágio de maturação verde e maduro.

TABELA 1 – VALORES MÉDIOS DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS (ºBRIX) DA POLPA DAS AMOSTRAS DE MARACUJÁ EM DIFERENTES GRAUS DE MATURAÇÃO

Amostra de maracujá	ºBrix
Amarelo	12,78 (±1,48)
Verde	8,11 (±2,60)

De acordo com Tavares *et al.* (2011), é possível identificar a presença da PME em material liofilizado, uma vez que estes autores trabalharam com mucilagem de inhame liofilizada, na qual detectaram a presença desta enzima. Entretanto, sabe-se que as enzimas podem desnaturar durante a liofilização, ocorrendo diminuição ou perda de atividade durante o congelamento e o armazenamento das amostras (SILVA, 2002).

Na Tabela 2 encontram-se os resultados obtidos da determinação da atividade da enzima PME em extrato bruto, do albedo do maracujá-amarelo nos estádios de maturação verde e maduro frescos e a comparação com amostras liofilizadas.

No método 1 foram utilizados como reagentes de extração o E.D.T.A. como quelante de íons, principalmente o Ca^{+2}, o metabissulfito de sódio e o 2-mercaptoetanol

com ação antioxidante, para inibir a ação dos compostos fenólicos presentes. A utilização isolada de cada um destes reagentes não é satisfatória de acordo com Cardello e Lourenço (1992), que determinou ainda que um aquecimento de 50 ºC por uma hora é suficiente para a retirada da pectina que ocasiona a formação de gel estável no extrato enzimático bruto.

TABELA 2 – COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE DE PME EM EXTRATO BRUTO (Umin/mL) OBTIDA DO ALBEDO DO MARACUJÁ-AMARELO POR DIFERENTES MÉTODOS, GRAU DE MATURAÇÃO (VERDE/MADURO) e situação da amostra (f/g DE MASSA FRESCA).

	Maracujá-amarelo fresco	Maracujá-amarelo liofilizado	Maracujá-verde fresco	Maracujá-verde liofilizado
Método 1	$1,1\pm0,3^{cB}$	$4,2\pm0,4^{bB}$	$4,7\pm2,5^{bB}$	$33,2\pm4,3^{bcA}$
Método 2	$4,2\pm0,9^{bC}$	$38,1\pm11,8^{abB}$	$10,9\pm0,7^{aC}$	$68,5\pm0,9^{aA}$
Método 3	$2,2\pm0,6^{cB}$	$51,0\pm26,2^{aA}$	$2,7\pm0,2^{bB}$	$17,7\pm5,9^{cB}$
Método 4	$3,8\pm0,2^{bB}$	$28,4\pm7,0^{abAB}$	$3,1\pm0,5^{bB}$	$67,4\pm26,6^{abA}$
Método 5	$6,2\pm0,2^{aC}$	$57,1\pm1,1^{aB}$	$3,2\pm1,1^{bC}$	$83,3\pm7,5^{aA}$

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

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

No método 4, a extração foi realizada de forma a evitar a perda de atividade pela inibição dos fenólicos e permitir a solubilização da pectinametilesterase da parede celular. A amostra foi homogeneizada em água ultra-pura gelada contendo 500 mg L^{-1} de sulfito de sódio, seguido por centrifugação a 15.000 g por 30 minutos a +4,0 ºC sendo o *pellet* ressuspendido em de água ultra-pura gelada também com 500 mg L^{-1} de sulfito de sódio e centrifugada novamente. Esse procedimento permite eliminar substâncias solúveis como proteínas, fenólicos, açúcares e pectinas (DENE'S, BARON e DRILLEAU, 2000). Como a PME é uma enzima ligada a parede celular nos vegetais por meio de ligações iônicas, é necessária para a sua extração a utilização de soluções de alta força iônica ou o aumento de pH do meio (BENEN, VAN ALEBEEK e VORAGEN, 2003).

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

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

Também foi possível perceber que amostra verde liofilizada apresentou maior atividade da PME em quase todos os métodos, de acordo com a Tabela 2. Fato semelhante foi encontrado por Awad e Young (1980), que trabalhando com frutos do abacateiro perceberam que a liofilização aumentou em 29 % e 46 % a atividade da PME para os cultivares Fuerte e Hass, respectivamente. Este fato também pode ser percebido com as amostras liofilizadas de albedo de maracujá, com aumento na atividade enzimática. Isto significa que o melhor material para extração da pectinametilesterase é o material liofilizado, indicando que o processo de liofilização não afeta a PME do maracujá.

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

De acordo com Tucker (1993), a atividade da enzima PME pode sofrer oscilações ao longo do período de maturação. Isso depende de fatores diversos, como tipo do fruto e o método de extração utilizado. Essas variações na atividade podem ocorrer devido à existência conjunta da PME com isoformas ou alguns inibidores, como o íon H_3O_+ formado durante a desmetilação da pectina (BORDENAVE e GOLDBERG, 1993).

Em relação ao grau de maturação e a situação da amostra, percebe-se que as amostras verdes liofilizadas apresentaram resultados mais satisfatórios que as amostras frescas (tanto verde quanto amarela). A atividade de PME é maior em frutos verdes, e diminui à medida que amadurecem e secam na planta (ALI *et al.*, 2004). Estudos com

grãos de café em diferentes graus de maturação demonstraram que a atividade da PME é maior em frutos verdes e diminui ao longo da maturação (PIMENTA, CHAGAS e COSTA, 2000).

A partir destes resultados, o maracujá verde liofilizado apresentou maior atividade, estatisticamente significativa, em quatro dos métodos utilizados (maior frequência de letras A maiúsculas na Tabela 2). Em quase todas as extrações foi possível perceber maior atividade de PME, estatisticamente significativa, no método 5, seguida do método 2 (maior frequência de letras a minúsculas na Tabela 2). Percebe-se que a atividade nas amostras submetidas ao processo de liofilização foi superior às amostras frescas, indicando que o processo é capaz de manter a enzima ativa além de concentrá-la.

Os ensaios de atividade enzimática devem ocorrer em pH similar para evitar mudanças na coloração. Entretanto, tampões acabam por interferir com a medida da produção de ácido, assim, os reagentes devem ser preparados sem tampão ou tampão fraco (HARGEMANN e AUSTIN, 1986). Sendo o ponto de viragem do azul de bromotimol entre 6,0 e 7,6, e a absorbância máxima a 620 nm, esse indicador se torna indicado para determinação de atividade de PME nas condições de pH dentre desta faixa de viragem (GONZALEZ, 2009). Porém, como nos estudos iniciais com PME não é possível afirmar com certeza qual a faixa de pH ótimo, utilizou-se o pH 7,5 em todas as reações de determinação de atividade. Sabe-se que em pH's mais alcalinos pode haver hidrólise da pectina, portanto atividades medidas nesse pH não são confiáveis (FAYYAZ *et al.,* 1994).

A extração depende da concentração salina e do pH do meio extrator, bem como a atividade da enzima depende da presença de cátions mono ou divalentes no meio de reação (CATUTANI, 1982). Cátions competem pelos grupos carboxílicos da pectina e deslocam a enzima do complexo pectina-PME (CORREDIG, KERR e WICKER, 2000). A PME pode ser ativada na presença de cátions mono e divalentes, mas não de ânions, sendo que cátions divalentes são 5-20 mais efetivos na ativação da PME do que os monovalentes (REXOVA-BENKOVA e MARKOVIC, 1976).

A estimativa da fase de amadurecimento com maior atividade enzimática poderá ser útil para estabelecer a melhor época de colheita, visando tanto a manutenção da qualidade da polpa, quanto do aproveitamento posterior do resíduo. Há discussão sobre o ponto de colheita, sendo indicada como uma estratégia colher frutos mais verdes, sadios e similares para procurar garantir uma melhor qualidade da matéria-prima, consequente redução das perdas (MARCHI *et al.,* 2000).

4. CONCLUSÃO

Foi possível detectar a atividade enzimática correspondente à PME em albedo de maracujá-amarelo, de acordo com as técnicas testadas. Os cinco métodos de extração influenciaram na atividade da enzima, com diferenças pequenas ou inexistentes em nível estatístico. Em relação ao grau de maturação, a maior atividade foi na amostra verde. A amostra liofilizada apresentou maior atividade enzimática que a fresca.

5. REFERÊNCIAS

AGUIRRE, O. M.; LOZANO, S. E.; OCAMPO, M. A.; TORRES, K. B.; MARTÍNEZ, A. V.; APARICIO, A. J. Cambios em la actividade de α-amilasa, PME e PG durante la maduración del maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* var. flavicarpa Deg.). **Revista de Ciência y Tecnología de America**, v. 31, n. 10, p. 728-733, out. 2006. Disponível em: <http://www.interciencia.org/v31_10/728.pdf>. Acesso em: 17 maio 2012.

ALI, Z. M.; CHIN, L.; MARIMUTHU, M.; LAZAN, H. Low temperature storage and modified atmosphere packaging of carambola fruit and their effects on ripening related texture changes, wall modification and chilling injury symptoms. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 181-192, 2004.

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

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

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

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

CANTERI, M. H. G**. Caracterização comparativa entre pectinas extraídas do pericarpo de maracujá-amarelo (Passiflora edulis f. flavicarpa).** Universidade Federal do Paraná - Université D'avignon Et Pays De Vaucluse. 2010. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos e Docteur en Science des Procédés, Sciences des Aliments). Curitiba, 2010, 162f.

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

CATUTANI, A. T. **Pectinesterase de mamão**. Universidade de São Paulo, 1982. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos). São Paulo, 1982, 76f.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças**: fisiologia e manuseio. 2ª ed. Lavras: ESAL/FAEPE, 2005.
CORREDIG, M.; KERR, W.; WICKER, L. 2001. Separation of thermostable pectinmethylesterase from marsh grapefruit pulp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 48, 4918-4923, 2000.

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

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

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

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

FIGUEIREDO, L. P.; VALENTE, W. A.; DIAS, M. V.; BORGES, S. V.; PEREIRA, P. A. P.; PEREIRA; A. G. T.; CLEMENTE, P. R. Efeito da adição de suco de maracujá e tempo de cozimento sobre a qualidade de doces do albedo de maracujá em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 840-846, dez. 2009. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612009000400022script=sci_ arttext> acesso em 25-mai-2012.

FONTES, R. V.; SANTOS, M. P.; FALQUETO, A. R.; SILVA, D. M. Atividade da pectinametilesterase e sua relação com a perda de firmeza da polpa de mamão cv. Sunrise Solo e Tainung. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 54-58, mar. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452008000100012> acesso em 25-mai-2012.

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

GONZALEZ. S. L.; ROSSO, N. D. Determination of pectin methylesterase activity in commercial pectinases and study of the inactivation kinetics through two potenciometric procedures. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 412-417, abr./jun. 2011.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 987–996, fev. 2003. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959202002030>. Acesso em 30 junho 2012.

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

HERRON, S. R.; BENEN, J. A.; SCAVETTA, R. D.; VISSER, J.; JURNAK, F. Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. **Proc Nati Acad Science,** USA, v. 97, n. 16, 8762-8769, ago. 2000. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/97/16/8762.full.pdf+html>. Acesso em 25 jun. 2012.

HUISMANN, M. M. H.; OOSTERVELD, A.; SCHOLS, H. A. Fast determination of the degree of methyl esterification of pectins by head-space GC. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 4, p. 665-668, jul. 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X0300184X>. Acesso em 28 maio 2012.

ISHIMOTO, F. Y.; HARADA, A. I.; BRANCO, I. G.; CONCEIÇÃO, W. A. S.; COUTINHO, M. R. Aproveitamento Alternativo da Casca do Maracujá-Amarelo (*Passiflora edulis* f. var. *flavicarpa* Deg.) para Produção de Biscoitos. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 9, n. 2, jul./dez. 2007. Disponível em: <http://www.sumarios.org/sites/default/files/pdfs/30636_4023.PDF>. Acesso em 25 maio 2012.

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

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, set. 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511305001765>. Acesso em 28 maio 2012.

JANEBRO, D. I.; QUEIROZ, M. S. R.; RAMOS, A. T.; SRUR, A. U. O. S.; CUNHA, M. A. L.; DINIZ, M. F. F. M. Efeitos da farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora eulis* f. *flavicarpa* Deg.) nos níveis glicêmicos e lipídiocs de pacientes diabéticos tipo 2. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, 724-732, 2008.

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

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852400001188>. Acesso em 16/04/12.

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

LIU, H.; JIANG, W.; ZHOU, L.; et al. The effects of 1-methylcyclopropene on peach fruit (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) ripening and disease resistance**. International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 40, p.1-7, 2005.

LY-NGUYEN, B.; VAN LOEY, A.; FACHIN, D.; VERLENT, I.; HENDRICKX, I. M. Purification, Characterization, Thermal, and High-Pressure Inactivation of Pectin Methylesterase from bananas (cv Cavendish). **Biotechnology and Bioengineering**, v.78, n. 6, p. 683-691, jun. 2002b. Disponível em: <http://www.ctu.edu.vn/guidelines/scientific/scientific/pdffiles/doc_lnbinh/papers/paper1_LNBINH.pdf>. Acesso em 20 abr. 2012.

MARCHI, R.; MONTEIRO, M.; BENATO, E. A.; SILVA, C. A. R. Uso da cor da casca como indicador de qualidade do maracujá amarelo (*Passiflora edulis Sims. f. flavicarpa Deg*.) destinado à industrialização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** vol.20 nº3 Campinas Sept./Dec. 2000.

OLIVEIRA, L. F.; NASCIMENTO, M. R. F.; BORGES, S.V.; RIBEIRO, P. C. N.; RUBACK, V. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. FLAVICARPA) para produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 3, n. 22, p. 259-262, set./dez. 2002. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/cta/v22n3/v22n3a11.pdf>. Acesso em 25/05/12.

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

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

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

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

SAINZ, R. L.; SILVA, E. B.; VENDRUSCOLO, J. L.; ANTUNES, P. L.; TORALLES, R. P.; Silva, R. S. Determinação do pH Ótimo De Extração de Pectinametilesterases em Pêssegos (*Prunus persica*) cv.ELDORADO. In: XIII Congresso de Iniciação Científica e VI Encontro e Pós-Graduação, 2004, Pelotas - RS. **Anais do XIII Congresso de Iniciação Científica e VI Encontro de PósGraduação**. Pelotas: UFPel, 2004. Disponível em <www2.ufpel.edu.br/cic/2004/arquivos/CA_01314.rtf>. Acesso em: 27 /07/2012.

SILVA, R. **Efeito da liofilização sobre a estrutura e atividade enzimática da Lasparaginase de *Escherichia coli*.** São Paulo, 2002. 88 p. Dissertação (Mestre em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo – (USP). Disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134/tde-13092006-115358/pt-br.php>. Acesso em 30/06/2012.

ŞİMŞEK, Ş. **Production of Commercially Suitable Pectin methylesterase and Polyphenol oxidase from Agro-industrial Wastes**. 2004. Dissertação, (Mestre em Ciências), İzmir Institute of Technology. Turkey, 2004, 94f.

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

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

VORAGEN, A. G. J.; COENEN, G.- J.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 263–275, 2009. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/w82h8866jh4w0361/>. Acesso em 28/05/12.