UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Estudos de conservação de mandioquinha-salsa (*Arracacia
xanthorrhiza* Bancroft.): efeitos da embalagem, radiação
gama e temperatura de armazenamento

Helena Pontes Chiebao

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Flávio Finardi Filho

São Paulo
2008

Helena Pontes Chiebao

Estudos de conservação de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.): efeitos da embalagem, radiação gama e temperatura de armazenamento

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Flávio Finardi Filho
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Flávio Finardi Filho pela orientação, e calorosa acolhida em seu laboratório, que foi minha segunda casa por esses dois anos e meio.

A minha família: meus pais Sonia e Erli, minhas irmãs Fernanda e Daniela e meus cunhados Frederico e Eduardo pelo apoio, pela paciência e humor durante os vários momentos “cientificamente falando”.

As minhas amigas Maria Lúcia Cocato e Renata Trommer de Campos Vaz pela ajuda, pelas idéias, pelo apoio nos momentos difíceis.

As colegas de laboratório, amigas de todas as horas, que colaboraram de diversas formas: Cintia Gisela Bezutti Giora, Renata Trommer de Campos Vaz, Gerby Giovanna Rondan Sanabria, Valdinéia Aparecida de Oliveira, Natália Eudes Fagundes de Barros e Beatriz Valcárcel Yamani.

A todos os funcionários e alunos do Depto. de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, em especial a Joana de Almeida Santos, Monica Dealis Perussi, Edilson Feitosa dos Santos e Cleonice Estrela C. Gonçalves.

Ao Prudencio Kenyu Senaga, do Irmãos Senaga LTDA, do CEAGESP de São Paulo pela doação das amostras utilizadas neste trabalho.

A EMBRARAD, e ao Prof. Dirceu Martins Vizeu, por possibilitarem a irradiação das amostras em suas dependências.

A Profa. Dra. Mariza Landgraf pela colaboração e permissão da utilização de seu laboratório, à técnica Katia Leani pela colaboração no desenvolvimento das análises microbiológicas e sua enorme simpatia durante a minha “invasão”, e a todos os alunos do Lab. de Microbiologia de Alimentos.

Ao Lab. de Tecnologia de Alimentos (bloco 16) pela utilização do Texturômetro e ao técnico Alexandre Mariani Rodrigues por me ensinar como utilizá-lo.

A Bruna Kempfer Bassoli pela análise estatística dos dados.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado, e a FAPESP pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorriza* Bancroft.) é uma raiz tuberosa que apresenta um curto período de conservação pós-colheita, de 3 a 5 dias, devido a uma fitopatologia conhecida como apodrecimento-mole ou “mela”, causada por bactérias do gênero *Erwinia*. Essas bactérias liberam enzimas que degradam a pectina da parede celular, fazendo com que o tecido perca a sua rigidez característica. Atualmente, vários métodos de conservação têm sido estudados na tentativa de prolongar a conservação pós-colheita, porém, a combinação de processos parece ser a melhor alternativa. Esse trabalho teve como objetivo estudar a interação entre processos de conservação (refrigeração, embalagem a vácuo e irradiação) para estender o período pós-colheita das raízes. Foram estudadas a combinação de duas temperaturas (25°C e 4°C), duas embalagens (caixas e vácuo) e três doses de irradiação gama obtendo um total de 16 grupos. Estes foram analisados diariamente, por um período de 30 dias, utilizando parâmetros de textura (energia de penetração), microbiologia e atividade de enzimas pectinolíticas (pectato liase, poligalacturonase e pectinesterase). A exposição às doses de 2 e 3kGy, com as amostras conservadas a 4°C a vácuo, prolongaram o período de conservação de 5 para 28 dias, ocorrendo uma diminuição da população microbiana, porém havendo uma diminuição da rigidez das raízes ($p<0,05$). Os tratamentos afetaram o perfil de atividade das enzimas pectinolíticas.

Palavras chave: tubérculo; *Erwinia*; enzimas pectinolíticas; textura

ABSTRACT

Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.) is a tuber root that presents a short post-harvest period of conservation, 3 to 5 days, due to a phytopathology known as soft rot or “mela”, caused by the bacteria of the genus *Erwinia*. This bacteria release enzymes that destroy the cellular wall, causing the lost of the characteristic rigidity. At present, many conservation methods have been studied in the attempt of prolonging the post harvest conservation, but the combination of processes seems to be the best alternative. The aim of this work was to study the interaction between the conservation processes (refrigeration, vacuum packaging and irradiation) to extend the post-harvest period of the roots. It was studied the combination of two temperatures (25°C e 4°C), with two packages (boxes and vacuum) and three gamma irradiation doses (1, 2 e 3kGy), obtaining a total of 16 sample groups. The samples were daily analyzed, for a 30 day period, using texture parameters (penetration energy), microbiology and pectinolytic enzymes activities (pectate lyase, polygalacturonase and pectin methyl esterase). The exposition to the doses of 2 and 3kGy, vacuum packed and stored at 4°C extend the post-harvest period of 5 to 28 days, with a decrease of the microbiologic population, but with decreased in the rigidity of the roots ($p<0.05$). The treatments affected the pectinolytic enzymes profile.

Key words: tuber; *Erwinia*; pectinolytic enzymes; texture

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1 – Meio de cultura CVP inoculado com <i>Erwinia</i> spp. onde pode ser visualizado as cavidades características formadas pela produção de exoenzimas.	20
Figura 2 – Cadeia primaria da pectina formada por homogalacturonanas.	24
Figura 3 – Modelo estrutural da RG-I.	25
Figura 4 – Modelo estrutural da RG-II. Quatro cadeias diferentes de oligossacarídeos (A-D) estão ligadas ao esqueleto.	26
Figura 5 – Ligação cruzada borato 1:2 diol éster que liga duas unidades monoméricas de RG-II. O éster pode existir de duas formas diastereométricas: em A, um grupo “R” (oligoglicose) esta virado para cima e o outro virado para baixo, enquanto que em B, ambos grupos “R” estão virados para cima.	27
Figura 6 – Raízes de mandioquinha-salsa armazenadas a 25°C, em sacos plásticos abertos, com diferentes doses de irradiação.	63
Figura 7 – Raízes de mandioquinha-salsa armazenadas a 25°C, a vácuo, com diferentes doses de irradiação.	64
Figura 8 – Raízes de mandioquinha-salsa armazenadas a 4°C, em sacos plásticos abertos, com diferentes doses de irradiação.	65
Figura 9 – Raízes de mandioquinha-salsa armazenadas a 4°C, a vácuo, com diferentes doses de irradiação.	67
Figura 10 – Raízes de mandioquinha-salsa armazenadas a 4°C, em caixas, apresentando níveis diferentes de lesão por frio, expostas a três doses de irradiação: (A) controle, (B) 1kGy, (C) 2kGy e (D) 3kGy após 4 dias de conservação.	68
Figura 11 – Influência da embalagem na textura das raízes não irradiadas armazenadas a 25°C(A) e 4°C (B).	73
Figura 12 – Influência da temperatura de armazenamento na textura de raízes não irradiadas armazenadas em caixas (A) e vácuo (B).	74
Figura 13 – Curva de crescimento microbiano de bactérias pectinolíticas isoladas em raízes de mandioquinha-salsa.	83

- Figura 14** – Atividade da enzima pectato liase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada em caixas a 25°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy. 86
- Figura 15** – Atividade da enzima pectato liase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada a vácuo a 25°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy. 87
- Figura 16** – Atividade da enzima pectato liase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada em caixas a 4°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy. 88
- Figura 17** – Atividade da enzima pectato liase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada a vácuo a 4°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy. 89
- Figura 18** – Efeito da embalagem sobre a atividade de Pel com amostras não irradiadas armazenadas a 25°C (A) e a 4°C (B). 92
- Figura 19** – Influência da temperatura sobre a atividade de PeL com amostras não irradiadas armazenadas em caixas (A) e a vácuo (B). 93
- Figura 20** - Atividade da enzima poligalacturonase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada em caixas a 25°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy. 94
- Figura 21** - Atividade da enzima poligalacturonase em raízes de 95

mandioquinha-salsa armazenada a vácuo a 25°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy.

Figura 22 - Atividade da enzima poligalacturonase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada em caixas a 4°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy. 96

Figura 23 - Atividade da enzima poligalacturonase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada a vácuo a 4°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy 97

Figura 24 – Influência da embalagem na atividade de PG em amostras não irradiadas de mandioquinha-salsa armazenada a 25°C (A) e 4°C (B). 99

Figura 25 – Efeito da temperatura sobre a atividade de PG de raízes não irradiadas de mandioquinha-salsa armazenadas em caixas (A) e a vácuo (B). 100

Figura 26 - Atividade da enzima pectinesterase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada em caixas a 25°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy. 101

Figura 27 - Atividade da enzima pectinesterase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada a vácuo a 25°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy. 102

Figura 28 - Atividade da enzima pectinesterase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada em caixas a 4°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy.	103
Figura 29 - Atividade da enzima pectinesterase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada a vácuo a 4°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy.	104
Figura 30 – Influência da embalagem na atividade de PME em amostras não irradiadas de mandioquinha-salsa armazenada a 25°C (A) e 4°C (B).	107
Figura 31 – Efeito da temperatura sobre a atividade de PME de raízes não irradiadas de mandioquinha-salsa armazenadas em caixas (A) e a vácuo (B).	108
Quadro 1 – Delineamento experimental do ensaio preliminar	51
Quadro 2 – Calendário da coleta de amostras para o ensaio de conservação no período de fevereiro/março de 2008.	53
Quadro 3 – Delineamento experimental do ensaio de conservação.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características bioquímicas chave na distinção de três espécies de <i>Erwinia</i> pectinolíticas.	13
Tabela 2 – Composição química da mandioquinha-salsa.	61
Tabela 3 - Tempo de viabilidade de amostras de mandioquinha-salsa, embaladas a vácuo ou não, armazenadas em temperatura ambiente (25°C) ou em câmara fria (4°), com diferentes doses de irradiação gama.	67
Tabela 4 – Textura das amostras armazenadas a 25°C, em caixas.	70
Tabela 5 - Textura das amostras armazenadas a 25°C, a vácuo .	70
Tabela 6 - Textura das amostras armazenadas a 4°C, em caixas.	71
Tabela 7 - Textura das amostras armazenadas a 4°C, a vácuo.	72
Tabela 8 – Contagem total de microrganismos mesófilos presentes em raízes de mandioquinha-salsa submetidas a três doses de irradiação, embaladas em caixas ou a vácuo, mantidas a 25°C (UFC/g de amostra).	78
Tabela 9 - Contagem total de microrganismos mesófilos presentes em raízes de mandioquinha-salsa submetidas a três doses de irradiação, embaladas em caixas ou a vácuo, mantidas a 4°C (UFC/g de amostra).	79
Tabela 10 – Contagem do número de bactérias que causaram lesão de apodrecimento-mole em frutos de pimentão verde após 30 dias de armazenamento.	82
Tabela 11 – Capacidade relativa de maceração de bactérias pectinolíticas isoladas em raízes de mandioquinha-salsa.	84

SUMÁRIO

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	viii
Sumário	ix
1. Introdução	1
2. Revisão da literatura	3
2.1. Mandioquinha-salsa	3
2.2. Bactérias do gênero <i>Erwinia</i>	11
2.2.1. Meios de cultura seletivos	17
2.3. Pectina	21
2.4. Enzimas pectinolíticas	28
2.5. Processos de conservação de mandioquinha-salsa	33
2.5.1. Conservadores químicos	34
2.5.2. Refrigeração	37
2.5.3. Embalagem	39
2.5.4. Irradiação	41
3. Objetivos	48
3.1. Geral	48
3.2. Específicos	48
4. Materiais e métodos	49
4.1. Composição química	49
4.1.1. Material	49
4.1.2. Métodos	49
4.1.2.1. Umidade	49
4.1.2.2. Cinzas	50
4.1.2.3. Proteína	50
4.1.2.4. Lipídeos	50

4.1.2.5. Fibras	50
4.2. Ensaio preliminar	50
4.2.1. Material	50
4.2.2. Métodos	52
4.3. Ensaio de conservação	52
4.3.1. Material	52
4.3.2. Métodos	54
4.3.2.1. Textura	54
4.3.2.2. Análises microbiológicas	55
4.3.2.2.1. Contagem total de microrganismos mesófilos	55
4.3.2.2.2. Isolamento de bactérias pectinolíticas	55
4.3.2.2.3. Capacidade relativa de maceração dos isolados	56
4.3.2.3. Análise das enzimas pectinolíticas	56
4.3.2.3.1. Extração e detecção de pectinesterase (PME) e poligalacturonase (PG)	56
4.3.2.3.2. Extração e detecção de pectato liase (PeL)	58
4.3.2.3.3. Teor de proteínas	59
4.4. Análise estatística	59
5. Resultados	61
5.1. Composição química	61
5.2. Ensaio preliminar	62
5.3. Ensaio de conservação	68
5.3.1. Textura	69
5.3.2. Análises microbiológicas	77
5.3.2.1. Contagem total de microrganismos mesófilos	77
5.3.2.2. Isolamento de bactérias pectinolíticas	81
5.3.2.3. Capacidade relativa de maceração (CRM) dos isolados	82
5.3.3. Atividade das enzimas pectinolíticas	84
5.3.3.1. Pectato liase (Pel)	85
5.3.3.2. Poligalacturonase (PG)	94

5.3.3.3. Pectinesterase (PME)	100
6. Conclusões	109
7. Referências bibliográficas	110
8. Anexos	124

1. INTRODUÇÃO

A mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.) é uma raiz tuberosa energética pela grande quantidade de carboidratos presente em sua composição, rica em fibras, vitamina A, niacina, cálcio, fósforo e ferro (CATI, 1999). Tem grande aceitação pelo consumidor sendo considerado um alimento nutritivo e saudável (HENZ; REIFCHNEIDER, 2005).

O Brasil está entre os quatro maiores produtores dessa raiz, porém a produtividade esta limitada ao consumo regional já que a mandioquinha-salsa apresenta um curto período de conservação pós-colheita, de 3 a 5 dias, o que limita a exportação da produção para locais distantes do local de cultivo, limitando o mercado consumidor.

O principal fator da rápida deterioração da mandioquinha-salsa é a perda de textura pela ação de enzimas pectinolíticas – pectato liase, poligalacturonase e pectinesterase – que degradam a pectina da parede celular, fazendo com que o tecido perca a sua rigidez característica. A liberação destas enzimas na lamela média da parede celular é o modo de ação das bactérias deteriorantes do gênero *Erwinia*, que causam a fitopatologia comumente conhecida como apodrecimento-mole ou “mela”. O apodrecimento-mole é responsável por grandes perdas da produção durante o transporte, armazenamento e comercialização das raízes, sendo considerada a doença mais importante que pode se desenvolver nas raízes (LOPES; HENZ, 1997).

Atualmente, vários métodos de conservação têm sido empregados para tentar aumentar a vida de prateleira de mandioquinha como a utilização de embalagens, conservantes químicos e redução da temperatura com o objetivo de controlar o desenvolvimento microbiano. Entre os resultados obtidos, a utilização de embalagens, para impedir a perda de matéria fresca, e a refrigeração, para diminuir o metabolismo microbiano, parecem ser os mais promissores (HENZ, 2001; HENZ; REIFCHNEIDER, 2005; RIBEIRO et al., 2005; RIBEIRO et al., 2007; SCALON et al., 2002a e b). Além desses processos, a irradiação gama foi estudada como um meio de diminuição da carga microbiana (IEMMA, 2001). Porém, a combinação de processos parece ser a melhor maneira de estender a vida pós-colheita das raízes.

Esse trabalho teve como objetivo estudar a interação entre processos de conservação (refrigeração, embalagem a vácuo e irradiação) para estender o período pós-colheita de raízes de mandioquinha-salsa, avaliando as atividades de três enzimas pectinolíticas – pectato liase, poligalacturonase e pectinesterase – ao longo do período de conservação, além da carga microbiana e alterações de textura que possam ocorrer, tanto devido à ação enzimática quanto ao processo de irradiação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Mandioquinha-salsa

A mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.) descrita por Bancroft em 1825 é uma raiz comestível pertencente à família Apiaceae (Umbelliferae) considerada a planta mais antiga cultivada na América do Sul, a única Umbelliferae domesticada, com a maior parte do seu cultivo confinado à América do Sul (HERMANN, 1997). Originária dos Andes, é cultivada no Brasil na região centro-sul (Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Espírito Santo), locais onde o clima é semelhante ao seu local de origem (LEONEL; CEREDA, 2002).

O cultivo da raiz ocorre em regiões de clima ameno, com altitudes entre 700 e 2000m, em países como a Colômbia, Equador, Venezuela, Brasil, Bolívia e Peru, e em menor escala na América Central e região do Caribe (Costa Rica, Porto Rico, Cuba e outros). Sua produção é mais expressiva em quatro países – Colômbia, Equador, Venezuela e Brasil - em uma área cultivada estimada em 30 mil ha (HENZ, 2001; HERMANN, 1997). A área plantada de mandioquinha-salsa no Brasil é de 16 mil hectares, reunindo cerca de nove mil produtores, sendo considerada uma atividade com vasto potencial de crescimento, principalmente por ser uma cultura bastante rústica, ter baixo custo de produção, e estar voltada principalmente para a agricultura familiar.

Diante da necessidade dos pequenos e médios produtores de aumentar a produtividade das lavouras, a Embrapa lançou uma nova variedade de mandioquinha-salsa, a *Amarela de Senador Amaral*, desenvolvida mediante a seleção de clones originários de sementes botânicas, coletadas no sul de Minas Gerais, oriundas do material tradicionalmente cultivado. Essa variedade *Amarela de Senador Amaral* vem sendo avaliada e caracterizada desde 1993 pela Embrapa Hortaliças, por produtores rurais e pelas instituições de Pesquisa e de Extensão Rural de diversos Estados brasileiros (CNPH-EMBRAPA, 2003).

A variedade *Amarela de Senador Amaral* atinge até 25 toneladas por hectare, contra as 8 toneladas de produção, alcançada pela variedade tradicional, a *Amarela Comum*, além de apresentar um ciclo de cultivo menor (de 7 a 8 meses), raízes mais uniformes (85% medem de 15 e 20 cm, tamanho considerado ideal pelos mercados consumidores), e preservar as peculiaridades do material tradicionalmente cultivado, como o aroma típico e o sabor adocicado (CATI, 1999; CNPH-EMBRAPA, 2003). Em 2001, cerca de 1500 famílias de produtores rurais dos Estados do Paraná, de São Paulo, Minas Gerais e Goiás, tiveram sua renda significativamente aumentada com a produção desta nova variedade, mais resistente a doenças, mais precoce no campo, e com maior produtividade (CNPH-EMBRAPA, 2003). Um projeto desenvolvido em parceria com o Núcleo de Produção de Sementes e Mudas da Secretaria da Agricultura conseguiu dobrar a média de produtividade da lavoura na região, que passou de 8 toneladas/hectare para 16 toneladas. Além da difusão de novas tecnologias e da capacitação dos produtores, uma das principais providências adotadas neste projeto foi substituir a antiga variedade pela variedade *Amarela de Senador Amaral*.

O aumento da produtividade da mandioquinha, graças ao plantio da nova variedade, foi tal que o resultado ultrapassou a demanda das raízes no mercado, gerando excesso de safra. Por ter um ciclo de cultivo menor, para alguns agricultores a colheita da variedade *Amarela de Senador Amaral* coincidiu com a colheita da variedade tradicional, contribuindo assim para que ocorresse um excedente de safra. Em meados de maio de 2004, os comerciantes do CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo) constataram a desvalorização do preço da mandioquinha (comercializada em caixas) em razão do aumento da produção.

Uma alternativa ao problema gerado pelo excesso de safra da mandioquinha-salsa seria a exportação das raízes para outros centros de comercialização, porém esta possibilidade está limitada em função da alta perecibilidade das raízes pós-colheita.

O principal mercado consumidor de mandioquinha-salsa no Brasil é o estado de São Paulo, abastecido principalmente pela produção dos estados de Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina, centralizado pela CEAGESP que redistribui o produto para a região metropolitana de São Paulo, interior do estado e também para outros mercados (HENZ, 2001; HENZ; REIFSCHNEIDER, 2005).

A raiz é comercializada no varejo principalmente a granel, exposta em gôndolas, onde o consumidor pode manusear o produto e escolher a quantidade e a qualidade desejada. Dessa forma, tem a validade de 3 a 5 dias. Porém, com a crescente demanda por produtos minimamente processados, e/ou orgânicos, novas formas de embalagens vêm sendo comercializadas como as raízes inteiras embaladas a vácuo,

com peso médio de 500g, e validade de 15 dias quando armazenadas em temperaturas entre 0 e 5°C; a comercialização de raízes inteiras em bandejas de isopor recobertas com filme plástico de PVC, mantidas ou não sob refrigeração, com validade de 3 a 7 dias; raízes descascadas acondicionadas em bandejas de isopor embaladas com filme de PVC ou com plástico de tripla camada; e raízes descascadas e fatiadas e embaladas à vácuo. (HENZ; REIFSCHNEIDER, 2005).

A mandioquinha-salsa, ou batata baroa, é considerada a cultura mais promissora entre as raízes e espécies tuberosas andinas por ter uma ampla aplicação culinária, pela aparente ausência de compostos indesejáveis como oxalatos, mucilagens, isotiocianatos e princípios adstringentes, além de ser capaz de se adaptar a uma variedade de ambientes tropicais (HERMANN, 1997).

Pode ser consumida cozida, frita ou em forma de purês, sopas e alimentos infantis. Caracteriza-se como um alimento energético devido ao seu alto teor de carboidratos, apresentando níveis consideráveis de vitamina A, niacina, cálcio, fósforo e ferro (CATI, 1999). É recomendada em dietas para crianças e idosos devido ao seu conteúdo de cálcio e fósforo, e pelas características do seu amido, que contém amilose em torno de 23%, grânulos arredondados, de difícil retrogradação e sinerese, fatores que contribuem para a sua grande digestibilidade (LEONEL; CEREDA, 2002; PÉREZ et al., 1999).

Henz e Reifchneider (2005) efetuaram um estudo preliminar da percepção do consumidor paulistano sobre a mandioquinha-salsa. De uma maneira geral, os consumidores paulistanos têm uma imagem muito positiva do tubérculo, associando o

seu consumo a uma alimentação nutritiva e saudável. Há uma preferência por raízes de tamanho médio a grande, cultivares de cor amarela, e pelo produto a granel, principalmente pela questão do preço em relação aos produtos pré-embalados. A maioria dos consumidores (73%) compra o produto em supermercados e feiras livres, conservando-o em sacos plásticos sob refrigeração, sendo que nessa condição duram em média três dias. O perfil dos entrevistados era constituído, na maioria, por consumidoras na faixa etária de 30 a 60 anos, pertencente à classe média, casadas, com famílias compostas de 3 a 5 membros.

A cultura de mandioquinha-salsa é tida como uma cultura rústica, com boa tolerância a doenças e pragas. Porém dificilmente as raízes atingirão o ponto de colheita sem apresentar problemas com algum tipo de doença ou praga devido ao seu ciclo relativamente longo, de 10 a 12 meses (HENZ, 2002). Entre os patógenos relacionados ao cultivo da mandioquinha-salsa foram registrados 27 gêneros de fungos, três de bactérias, nove de nematóides e cinco vírus. Destes, já foram relatados no Brasil treze gêneros de fungos, e todos os nematóides e bactérias, enquanto nenhum dos vírus foi oficialmente registrado (HENZ, 2002). O nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.) e o apodrecimento-mole pós-colheita causado por *Erwinia* spp. são as principais doenças e causam perdas significativas (HENZ, 2001; HERMANN, 1997). Essas perdas afetam consideravelmente as margens de comercialização.

A conservação da mandioquinha-salsa é um ponto crítico na sua comercialização. É considerada um produto altamente perecível, durando apenas de 2 a 3 dias na condição usual de exposição nos mercados varejistas, ou seja, raízes soltas em

gôndolas ou caixas abertas, sem embalagem ou refrigeração (HENZ; REIFSCHNEIDER, 2005).

Os principais fatores que podem acelerar a deterioração de produtos de origem vegetal são a taxa de respiração e de transpiração, e doenças associadas ao ataque de microrganismos (PIRES, 2005).

Avelar-Filho (1989) verificou que a taxa respiratória apresentada pela raiz de mandioquinha é baixa, não se constituindo, portanto, um fator preponderante à sua perecibilidade. A perda excessiva de matéria fresca, a incidência de injúrias mecânicas e as doenças que afetam a aparência do produto e seu valor como mercadoria são os principais problemas pós-colheita da mandioquinha-salsa. (AVELAR-FILHO, 1989; HENZ, 2001; HENZ et al., 2005; HERMANN, 1997; THOMPSON, 1980).

Henz et al. (2005) avaliaram os danos físicos que ocorrem nas raízes de mandioquinha devido ao impacto da queda no manuseio pós-colheita e suas conseqüências na durabilidade do produto. Foi constatado que a altura e a posição de soltura das raízes na queda afetaram diretamente a incidências de injúrias mais graves, como quebras e rupturas. Quando as raízes eram soltas na posição proximal ("ombro"), numa queda de 90cm, houveram 40,7% de rachaduras, 19,2% de rupturas e 22,3% de lesões superficiais, e 45,8% de rupturas e 23,3% de quebra quando na posição distal (ponta da raiz para baixo). As conseqüências dos danos mecânicos podem ser uma causa primária de perdas nas etapas subseqüentes porque aceleram a taxa de perda de água, levando a um acréscimo na taxa respiratória e à diminuição da matéria seca, tornando-se portas de entrada para microrganismos deteriorantes.

O apodrecimento-mole, ou “mela”, é a doença mais importante de que pode ser acometida a mandioquinha-salsa, pois responde por grandes perdas durante o transporte, o armazenamento e a comercialização das raízes (LOPES; HENZ, 1997). Muitas espécies de bactérias pertencentes aos gêneros *Erwinia*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Clostridium* podem causar doenças associadas ao tipo de sintoma conhecido como podridão-mole, caracterizado por um colapso dos tecidos vegetais e deterioração de partes de plantas (JAY, 2000). Uma das características comuns a todas essas bactérias é a capacidade de macerar enzimaticamente o tecido parenquimatoso de uma grande variedade de plantas, sintoma popularmente conhecido como “mela”.

A maior ocorrência e severidade das podridões-moles ocorrem em condições de temperaturas acima de 25°C e de altas taxas de umidade do solo e do ar, provocadas por irrigação excessiva ou períodos de chuva. Isso se deve, pois, a presença de água livre possibilita a infecção da planta. A infecção pode ocorrer através da entrada de bactérias nas raízes de mandioquinha através de ferimentos provocados por insetos, nematóides, e através das lenticelas, que devido ao encharcamento do solo e à baixa aeração se encontram expandidas (LOPES; HENZ, 1998). No período pós-colheita, a entrada pode ocorrer através das injúrias mecânicas, ou através da água de lavagem contaminada por bactérias do solo.

No pós-colheita, as raízes são lavadas durante 30 minutos em redes imersas em um tanque com água e agitadas por movimentos pendulares por um braço mecânico acionado por motores (HENZ, 2001). Apesar do conhecimento de que o processo de

lavagem acelera a ocorrência do apodrecimento-mole (HENZ, 2001; THOMPSON, 1980), é praticamente impossível comercializar a raiz sem lavar, como ocorre com a batata, por rejeição do consumidor. O processo de lavagem de raízes, embora melhore a aparência, contribui para o aumento da perda de água durante o período de comercialização, pois danifica a película externa de proteção e facilita a infecção por bactérias e fungos (ZÁRATE et al., 2001).

Henz (2001) avaliou o potencial de infiltração de água nas raízes durante o período em que ficam submersas, reproduzindo o processo de lavagem usualmente utilizado. O autor verificou uma alta correlação entre o tempo de imersão e a infiltração de água (0,95mL de água infiltrada em raízes intactas quando imersas por 120 minutos). Constatou também que o tempo de imersão e a profundidade aumentam a probabilidade de infiltração ou absorção de água pelas raízes, e possivelmente de bactérias através das lenticelas ou de lesões como já foi citado anteriormente. Nas lavadoras, as raízes permanecem de 20 a 50 minutos em profundidades que podem alcançar até 70cm.

No mesmo trabalho (HENZ, 2001), foi avaliado o potencial de perdas pós-colheita com raízes lavadas e sem lavar. Foi encontrada uma diferença estatística significativa na deterioração nas avaliações efetuadas três dias após o tratamento, onde em média o apodrecimento de raízes sem lavar foi de 6,5% e de 69,1% para raízes lavadas.

2.2 Bactérias do gênero *Erwinia*

O gênero *Erwinia* foi nomeado segundo o fitopatologista Erwin F. Smith (De BOER, 2003). São bacilos anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, Gram negativas, com peritríquias, altamente móveis (PÉROMBELON; KELMAN, 1980).

A principal característica que distingue a *Erwinia* de apodrecimento-mole das demais espécies de *Erwinia* é a capacidade de produzir grandes quantidades de enzimas pécnicas que as permite macerar o tecido parenquimatoso de uma ampla variedade de plantas (PÉROMBELON; KELMAN, 1980). Essa capacidade dos isolados em macerar tecido vegetal é o teste mais simples e rápido para caracterizar as bactérias desse gênero (HENZ, 2001).

As *Erwinia* pectolíticas causadoras de apodrecimento-mole pertencentes ao grupo “carotovora” incluem as seguintes espécies e subespécies: *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca), *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc), *E. carotovora* subsp. *betavasculorum*, *E. carotovora* subsp. *wasabiae*, *E. carotovora* subsp. *odorifera*, *E. chrysanthemi* (Ech), *E. cypripedii*, *E. rhapontici* e *E. cacticida* (De BOER; KELMAN, 2001). Entre as espécies de *Erwinia* pertencentes ao grupo pectolítico, Eca, Ecc e Ech são as mais importantes, principalmente para hortaliças (LOPEZ; HENZ, 1998; TAKATSU, 1983).

As subespécies de *Erwinia* que causam o apodrecimento-mole são membros da Família Enterobacteriaceae, juntamente com outros fitopatógenos como a *Erwinia amylovora* e patógenos humanos como a *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Apesar do

nome do gênero *Erwinia* ser o mais usado para descrever o grupo, foi proposto um nome alternativo para o gênero envolvendo as espécies causadoras do apodrecimento-mole de *Pectobacterium* (HAUBEN et al., 1998). Assim, as *Erwinia* seriam renomeadas da seguinte maneira *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum* (para Eca), *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* (para Ecc) e *Pectobacterium chrysanthemi* (para Ech). Porém, a nomenclatura ainda não foi amplamente adotada pela comunidade científica (HENZ et al., 2006; TOTH et al., 2003).

A diferenciação das espécies e subespécies de *Erwinia* causadoras de apodrecimento-mole é baseada nos seguintes testes: crescimento a 36-37°C; redução de substâncias a partir da sacarose, produção de ácido a partir de dulcitol, lactose, sorbitol, melibiose, citrato, rafinose, arabitól e maltose; utilização de ceto-metil glucosídeo; produção de indol; fosfatase; crescimento em NaCl (5%); sensibilidade a eritromicina; produção de indigoidina (azul) em meio de cultura BDA (batata-dextrose-água) (De BOER et al., 2001, HENZ, 2001). As características bioquímicas utilizadas para a diferenciação entre Ecc, Eca e Ech se encontram na Tabela 1.

Tabela 1 – Características bioquímicas chave na distinção de três espécies de *Erwinia* pectinolíticas (PÉROMBELON; KELMAN, 1980).

Testes Bioquímicos	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	<i>E. chrysanthemi</i>
Produção de ácido a partir de			
lactose:	+	+	- ou +
maltose:	-	+	-
α -metil-glucosideo	-	+	-
palatinose:	-	+	-
trealose:	-	-	+
Substâncias redutoras a partir de sacarose:	-	+	-
Utilização de malonato:	-	-	+
Utilização de tartarato:	-	-	+
Indol:	-	-	+
Crescimento em NaCl 5%:	+	+	- ou +
Lecitinase:	-	-	+
Fosfatase:	-	-	+
Eritromicina:	Resistente	Resistente	Sensível
Pigmento azul:	-	-	- ou +
Temperatura de crescimento (°C):			
mínima:	6	3	6
ótima:	28-30	27	34-37
máxima:	37-42	35	>45

O primeiro relato da ocorrência de *Erwinia* em raízes de mandioquinha foi feito em Burton (EUA), no ano de 1970. Posteriormente, em 1972, Cármino e Diaz Polano identificaram a *Erwinia amylovora* como o microrganismo responsável por essa doença em raízes de mandioquinha na Venezuela (HENZ, 2002). No Brasil, a podridão-mole foi primeiramente identificada no campo por Romeiro et al. (1988), no estado de Minas Gerais, sendo a *Erwinia carotovora* o microrganismo responsável. No Distrito Federal, outras sub-espécies do gênero foram identificadas como causadores da doença: *Ecc*, *Eca* e *Ech* (HENZ et al., 1992).

Jabuonski et al. (1986) avaliaram a presença de *Erwinia* pectinolíticas em 29 plantas hospedeiras, entre elas a batata, tomate e cenoura, provenientes principalmente do Distrito Federal, identificando através de testes bioquímicos os isolados. De um total de 302 isolados do gênero *Erwinia*, 159 foram identificados como sendo *Ecc*, 70 como sendo *Eca* e 25 como *Ech*. Com base nesses resultados, os autores consideraram a *Ecc* como sendo a mais importante do grupo das bactérias pectinolíticas no Brasil. Porém, o estudo não avaliou uma possível especificidade entre as espécies bacterianas e as plantas hospedeiras, e não utilizou a mandioquinha-salsa em seu estudo.

Já Henz et al. (2006) avaliaram e identificaram as bactérias pectinolíticas associadas ao apodrecimento-mole em mandioquinha-salsa no Brasil, no período de 1998 a 2001, adquiridos nos mercados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Distrito Federal. Foi observada a predominância de *Ech* (89,8%) como agente

causador do apodrecimento-mole, ao contrario do que anteriormente fora descrito, com a subespécie *Ecc* como predominante.

A colonização de plantas por *Erwinia* pectinolíticas antes do início da infecção é descrito como uma “infecção latente”. Apesar de sua natureza desconhecida, essa “infecção” pode durar vários meses, na qual o fitopatógeno pode atingir altas populações com ausência de sintomas visíveis. Neste estado biotrófico, parece que a *Erwinia* obtém nutrientes suficientes para sobreviver. Em condições ambientais ideais que comprometem a defesa do vegetal, como o aumento de água livre que provoca a diminuição de oxigênio, pode ocorrer a mudança do estado biotrófico para necrotrófico e ter início o desenvolvimento da doença (TOTH; BIRCH, 2005).

Ech e *Ecc*, como muitas bactérias fitopatogênicas facultativas Gram-negativas, podem desenvolver atividades fisiológicas tanto dentro do hospedeiro como fora, o que evidencia que os genes dos fatores de virulência são acionados em resposta a alterações ambientais (BARRAS et al., 1994).

Os estágios de desenvolvimento do apodrecimento-mole são: a multiplicação, sem a maceração do tecido, da bactéria latente presente em áreas que favoreçam a infecção, como em ferimentos e lenticelas. Quando atingido um número crítico, estimado em $10^7 - 10^8$ células/g, a bactéria começa a produzir e secretar uma grande variedade de enzimas líticas que irão degradar as células vegetais, órgão e tecidos. As enzimas pectinolíticas são induzidas entre as demais enzimas extra-celulares produzidas, tornando-se essenciais para a virulência de *Erwinia* pectinolíticas (SMADJA et al., 2004).

Os fatores necessários para o início do apodrecimento-mole são: (a) prevalência de condições anaeróbias, (b) água livre presente na superfície do tubérculo, (c) temperatura acima do mínimo necessário para a multiplicação do micorganismo, e (d) a presença de fatores fisiológicos que favoreçam a infecção. O apodrecimento é muito mais rápido em atmosfera com baixa concentração de O_2 do que em ar, efeito que é atribuído à diminuição da resistência do tubérculo (PÉROMBELON; KELMAN, 1980)

A água livre é essencial para as condições ideais do desenvolvimento da deterioração. Várias hipóteses foram levantadas para explicar a importância da água livre: pode permitir a movimentação das células bacterianas com maior facilidade através do tecido vegetal; o aumento da água livre pode levar à diminuição do oxigênio disponível, criando um ambiente micro-aeróbio ou anaeróbio (sob condições aeróbias, o apodrecimento pode ocorrer se o número de bactérias for muito grande); pode levar a um aumento da turgidez das células vegetais, especialmente as da lenticela, que, juntamente com a falta de oxigênio afetando a integridade celular, pode levar a um extravasamento do conteúdo celular. O aumento da disponibilidade de nutrientes, assim como a aparente redução da resistência do tubérculo sob condições anaeróbias, favorece o crescimento de bactérias pectinolíticas, permitindo a formação de uma lesão de apodrecimento-mole (PÉROMBELON; KELMAN, 1980; TOTH et al., 2003).

As exoenzimas são os fatores de virulência primários das *Erwinia* pectolíticas. As enzimas pectato liase, pectinesterase e poligalacturonase estão diretamente envolvidas na maceração do tecido vegetal pela digestão da pectina que liga as células vegetais (De BOER, 2003). Essas enzimas clivam as substâncias pécticas encontradas na

parede de células vegetais por β -eliminação, gerando oligômeros que são 4,5-insaturados na terminação não-redutora (BARRAS et al., 1994; COLLMER; KEEN, 1986; SMADJA et al., 2004), com exceção da poligalacturonase que cliva por hidrólise (COLLMER; KEEN, 1986). As *Erwinia* pectinolíticas também produzem outras exoenzimas como celulasas, fosfolipases e proteases (COLLMER; KEEN, 1986; HASEGAWA et al., 2005; HERMANN, 1997; PIRES, 2001; SMADJA et al., 2004; TOTH; BIRCH, 2005).

Muitas vezes a deterioração de hortaliças é acompanhada por um forte odor de putrefação, causado por microrganismos secundários e não pelas bactérias do gênero *Erwinia* (LOPES; HENZ, 1998).

2.2.1 Meios de cultura seletivos

O uso de meios de cultura seletivos adequados capazes de diferenciar, quantificar e isolar bactérias de interesse com confiança é primordial em uma análise.

Para bactérias capazes de degradar pectina, como as integrantes do gênero *Erwinia*, foram utilizadas diversas técnicas para identificação e isolamento ao longo dos anos.

Foi testado a princípio o uso de tecidos vegetais esterilizados para a detecção dos microrganismos capazes de provocar o apodrecimento mole e a degradação da pectina. Kerr (1953) colocava vegetais esterilizados em suspensões de solo por um

breve período, retirava-as e depois incubava. Se houvesse o apodrecimento mole do tecido, a bactéria era isolada. Mas a utilização dessa técnica isoladamente não foi considerada específica e nem precisa (CUPPELS; KELMAN, 1974).

A capacidade de diferenciação e seletividade da maioria dos meios esta baseada na prevenção ou no retardo do crescimento das células pelo uso de inibidores de vias metabólicas, por exemplo, metais pesados ou cristal violeta, e antibióticos que inibem a síntese de proteínas e ácidos nucleicos (KADO; HESKETT, 1970).

Kado e Heskett (1970) propuseram um meio para a identificação e isolamento de *Erwinia* pectinolíticas que utiliza, na constituição do seu meio, dodecil sulfato de sódio (SDS) que altera componentes da membrana celular resultando em uma redução ou ausência de permeabilidade seletiva. O meio também utiliza cloreto de lítio que pode afetar a síntese protéica, já que inibe a ligação do tRNA aos ribossomos. A identificação positiva se caracteriza pelo aparecimento de uma coloração vermelha no meio de intensidade variando conforme a espécie. O crescimento de outros gêneros de bactérias é geralmente inibido, mas podem crescer algumas espécies de *Xanthomonas* que podem ser facilmente diferenciadas pela produção de uma coloração azul ao redor das colônias.

Os meios onde há a formação de depressões ou áreas moles em meio contendo polipectato são os mais utilizados (HANKIN et al., 1971).

Hankin et al. (1971), acreditando que a pectina exerce um efeito sinérgico na indução da produção de pectato liase pela bactéria, testaram um meio sólido contendo

extrato de batata e um meio sólido contendo pectina e extrato de leveduras, que era mais fácil de ser preparado, pois o denominado “fator batata” é instável quando aquecido. A identificação positiva da atividade pectinolítica foi medida através da adição de uma solução de 1% de hexadeciltrimetilamonibrometo, que precipita os polissacarídeos que permaneceram intactos, formando assim halos translúcidos ao redor das colônias.

Cuppels e Kelman (1974) propuseram um meio seletivo para o isolamento de *Erwinia* contendo nitrato de sódio, como fonte de nitrogênio, polipectato de sódio e cristal violeta. Em comparação aos outros meios testados, foi obtida uma recuperação de 77-79% de *E. carotovora* a partir de uma amostra de solo, e uma redução de 97% da população bacteriana do solo que não é de interesse, podendo-se concluir ser um meio mais específico para o isolamento de *Erwinia*. As colônias de *Erwinia* pectinolíticas foram facilmente reconhecidas no meio cristal violeta pectato (CVP) pela formação de depressões profundas formadas no meio (Figura 1). As depressões formadas por outras bactérias pectolíticas eram usualmente rasas e largas. As pseudomonas fluorescentes pectolíticas foram reduzidas a menos de 0,1% quando adicionado sulfato de manganês ao meio CVP, porém a adição da solução torna o preparo mais demorado. O meio CVP é considerado o melhor e mais comumente usado para a identificação, isolamento e enumeração de subspécies de *Erwinia* causadoras de apodrecimento mole (HYMAN et al., 2001).

Figura 1 – Meio de cultura CVP inoculado com *Erwinia* spp. onde pode ser visualizado as cavidades características formadas pela produção de exoenzimas (TOTH et al., 2003).

O polipectato de sódio, utilizado na formulação do meio CVP, é responsável pela geleificação do meio e a degradação do mesmo pelas exoenzimas da bactéria forma as cavidades características. Inicialmente, Cuppels e Kelman (1970) utilizaram o polipectato de sódio da marca Sunkist®, porém, este se tornou indisponível no mercado em 1978 (COTHER et al., 1980). Hyman et al. (2001) realizaram os estudos necessários para a adaptação do meio utilizando um polipectado de sódio de baixa esterificação da marca Bulmer® (Slendid sodium polypectate type 440) que era largamente utilizado na indústria de alimentos dos Estados Unidos. Entretanto, este polipectato de sódio é de difícil aquisição no Brasil e mesmo no exterior (EL TASSA; DUARTE; 2004).

Para solucionar este problema, Takatsu et al. (1981) propuseram a utilização de frutos de pimentão como meio parcialmente seletivo para o isolamento de *Erwinia* pectinolíticas. Foram utilizados palitos de dente que foram introduzidos em lesões

moles de vegetais diversos e depois o palito era fincado no pimentão. O fruto foi mantido de 25 a 30°C em sacos plásticos e a bactéria isolada em meio contendo ágar antes que as lesões coalessem, isto é, quando apresentaram no máximo 1 cm de diâmetro. A utilização de frutos de pimentão tem sido utilizada por vários autores (EL TASSA; DUARTE, 2004; JABUONSKI et al., 1986) .

Apesar da possibilidade de utilização de meios seletivos e testes bioquímicos, os testes de identificação por técnica de PCR (polymerase chain reaction) têm maior confiabilidade e precisão na identificação de bactérias, apesar de seu elevado custo.

2.3 Pectina

As bactérias fitopatogênicas penetram nos tecidos vegetais de pelo menos três maneiras: digerindo a parede celular, entrando através de lesões, ou invadindo aberturas naturais como os estômatos. A pectina é um dos primeiros alvos da digestão iniciada pelos fitopatógenos (RIDLEY et al., 2001).

Pectina é a classe mais abundante de macromoléculas presente na matriz solúvel de polissacarídeos, glicoproteínas, proteoglicanos, compostos de baixo peso molecular e íons que envolvem a rede celulose-glicano que compõe a parede celular vegetal. A pectina se encontra em grande quantidade na lamela média entre as células da parede, onde tem como função a regulação da adesão intercelular (WILLATS et al., 2001).

A pectina é um dos principais componentes das células primárias da parede (cerca de um terço da composição), porém ausente em células secundárias (WILLATS et al., 2001). Entre as suas diversas funções, esse polissacarídeo está envolvido no controle da porosidade da parede celular, e, portanto, envolvido na regulação do transporte de íons; ela determina a capacidade de retenção de água da parede; influencia o crescimento e desenvolvimento de tecidos vegetais; e tem participação em processos fisiológicos importantes como o crescimento celular e diferenciação de tecidos, determinando a integridade e rigidez dos mesmos; tem um importante papel no mecanismo de defesa contra patógenos vegetais e em lesões (RIDLEY et al., 2001; SCHOLS; VORAGEN, 2003; WILLATS et al., 2001).

A degradação da pectina resultante da liberação de enzimas pectinolíticas pela bactéria fitopatogênica provoca uma cascata de reações que levam a planta a iniciar o seu processo de defesa. Como resultado, pode haver um reforço da parede celular, o fechamento dos estômatos, a síntese de fitoalexinas e outros compostos antibióticos, de proteínas relacionadas à patogênese e peptídeos tóxicos e, na tentativa de conter a infecção, pode haver a morte localizada de células e a produção de espécies reativas de oxigênio, incluindo H_2O_2 e O_2^- (RIDLEY et al., 2001).

A pectina compreende um grupo de polissacarídeos ricos em ácido galacturônico. A sua estrutura é composta por cadeias lineares e ramificadas que formam o esqueleto celular contendo três diferentes domínios de polissacarídeos. Esses polissacarídeos são as homogalacturonanas (HGA), as ramnogalacturonanas I (RG-I) e

ramnogalacturonanas II (RG-II) (RIDLEY et al., 2001; SCHOLS; VORAGEN, 2003; WILLATS et al., 2001).

A HGA é um homopolímero linear formado por ligações do tipo α (1 $\rightarrow$ 4) de unidades de ácido D-galacturônico, havendo proporções variadas de grupos carboxílicos esterificados com metanol, e grupos O-acetilados nos carbonos C2 e C3 (Figura 2). A HGA é abundante na pectina, e aparentemente é sintetizada pelo complexo de Golgi e depositada na parede celular de maneira a ter 70-80% de resíduos de ácido galacturônico metil-esterificados na carboxila C6. Pode ainda haver a O-acetilação das carboxilas C2 e C3, e a substituição de resíduos de ácido galacturônico por xilose (xilogalacturonanas) (WILLATS et al., 2001).

Figura 2 – Cadeia primaria da pectina formada por homogalacturonanas (fonte: RIDLEY et al., 2001).

A RG-I é um domínio ácido da pectina, sendo formada por pelo menos 100 repetições do dissacarídeo (1→2)-α-L-ramnose-(1→4)-α-D-ácido galacturônico. (Figura 3). A RG-I é abundante e heterogênea, e supõe-se que se liga através de uma ligação glicosídica à HGA. Cerca de 20 a 80% dos resíduos de ramnose estão substituídos no C4 por cadeias laterais onde predominam resíduos neutros, e estes

podem variar em tamanho de um único resíduo de glicosil até 50 resíduos ou mais, resultando em uma ampla e variada família de polissacarídeos (WILLATS et al., 2001).

Figura 3 – Modelo estrutural da RG-I (fonte: RIDLEY et al., 2001).

Apesar do nome, a RG-I não está relacionada estruturalmente a RG-II, mas é um domínio péptico ramificado que contém um esqueleto de HGA. A RG-II é um domínio altamente conservado que é isolado da parede celular através da ação de uma endopoligalacturonase, o que indica uma ligação covalente com a HGA. A RG-II tem um esqueleto de nove resíduos de ácido galacturônico que estão ligados por ligação α -(1→4), e que são substituídos por quatro cadeias laterais heteropoliméricas de tamanhos conhecidos. As cadeias laterais contêm onze açúcares diferentes incluindo

apiose, ácido acérico e 2-ceto-3-deoxi-D-ácido-mano-octulosônico (Figura 4). A RG-II parece ser o único domínio péptico importante que não tem uma diversidade estrutural significativa ou modulação da sua estrutura (WILLATS et al., 2001).

Figura 4 – Modelo estrutural da RG-II. Quatro cadeias diferentes de oligossacarídeos (A-D) estão ligadas ao esqueleto (fonte: RIDLEY et al., 2001).

A RG-II é presente na célula primária da parede celular como um dímero contendo uma ligação cruzada 1:2 borato-diol éster, como demonstrado na Figura 5. (RIDLEY et al., 2001).

Figura 5 – Ligação cruzada borato 1:2 diol éster que liga duas unidades monoméricas de RG-II. O éster pode existir de duas formas diastereométricas: em A, um grupo “R” (oligoglicose) está virado para cima e o outro virado para baixo, enquanto que em B, ambos grupos “R” estão virados para cima (fonte: RIDLEY et al., 2001).

As pectinas que possuem mais da metade de seus grupos carboxílicos na forma de éster metílico ($-\text{COOCH}_3$) são classificadas como pectinas com alto grau de

metoxilação e, por conseqüência, as que apresentam menos da metade são chamadas de pectinas de baixo grau de metoxilação. Pectinas com alto grau de metoxilação formam gel na presença de açúcares ou polióis, em meio ácido, enquanto que as pectinas com baixo grau de metoxilação formam gel somente na presença de cátions divalentes (RIDLEY et al., 2001).

Devido a sua capacidade de geleificação, a pectina é amplamente utilizada pela indústria de alimentos na fabricação de marmeladas e geléias. Também é usada como geleificante, emulsionante e estabilizante em bebidas e sorvetes (BELITZ et al., 2004).

A textura de vegetais durante o crescimento, amadurecimento e armazenamento é fortemente influenciada pela quantidade e composição das moléculas pécticas presentes. Conseqüentemente, a estrutura da pectina presente em vegetais depende das modificações enzimáticas e químicas que ocorrem durante esses processos. Enzimas endógenas assim como exógenas desempenham um papel importante na determinação das estruturas pécticas presentes em tecidos vegetais ou produtos alimentícios em um dado momento (SCHOLS; VORAGEN, 2003).

2.4 Enzimas pectinolíticas

Dentre as enzimas que atuam na parede celular de plantas, as enzimas pécticas e as celulasas são as principais responsáveis pelos processos de amolecimento de vegetais. Enzimas pécticas altamente purificadas podem macerar e destruir tecidos

vegetais de maneira similar a que ocorre no apodrecimento-mole (BARRAS et al., 1994; COLLMER; KEEN, 1986). Mesmo no caso de doenças relacionadas à pós-colheita, como no caso do apodrecimento-mole, provocado pela *Erwinia*, a raiz apresenta um alto grau de amolecimento, que pode ser atribuído à ação de enzimas pectinolíticas, como a pectato liase, produzida pela bactéria causadora da doença (PIRES, 2005).

As bactérias do gênero *Erwinia* tendem a se multiplicar mais rapidamente e produzem mais enzimas pécticas em quase todas as condições de plantio do que outras bactérias pectinolíticas, como o *Clostridium* spp., o *Bacillus* spp, e o *Pseudomonas* spp. A bactéria produz uma série de enzimas que atuam na parede celular da planta, incluindo pectinases, celulasas, proteases e xilanases, que apresentam diferentes propriedades bioquímicas, como ponto isoelétrico ácido ou básico, atividade ótima em distintos valores de pH, expressão intra- ou extracelular e mecanismo de ação como endo- ou exoenzima. A habilidade de produzir uma grande variedade de enzimas e isoenzimas mais rapidamente e em maior quantidade que os microrganismos saprófitas pectinolíticos torna a *Erwinia* apta a infectar plantas com mais eficiência (PÉROMBELON, 2002). Em relação às enzimas produzidas pela bactéria, as enzimas pectinolíticas são consideradas as mais importantes em patogenicidade, pois são responsáveis pela maceração do tecido e, conseqüentemente, pela morte da planta. Isso ocorre devido à degradação de substâncias pécticas na lamela média, localizada entre as células do vegetal.

Quatro principais tipos de enzimas pectinolíticas são produzidos: a pectato liase (Pel), a pectina liase (PL) e a pectina metil esterase (PME), que apresentam um pH ótimo em torno de 8,0, e a poligalacturonase (PG), com pH ótimo de atividade enzimática em torno de 6,0 (PÉROMBELON, 2002). A produção destas enzimas é o fator de virulência primário provocado por *Erwinia* pectinolíticas (De BOER, 2003). A pectato liase é considerada a principal pectinase na patogênese (TOTH et al., 2003).

Pires (2005) verificou a relação direta entre o aumento da atividade de enzimas pectinolíticas e o crescimento microbiano em raízes de mandioquinha-salsa. As raízes foram acondicionadas a vácuo e armazenadas tanto a temperatura ambiente quanto sob refrigeração. As raízes armazenadas a vácuo e à temperatura ambiente se degradaram completamente já no quarto dia de armazenamento, apresentando um amolecimento substancial e produção de gás e açúcares, acompanhados do aumento significativo na atividade de enzimas pectinolíticas – pectinesterase, poligalacturonase e pectato liase – neste mesmo período. Neste mesmo trabalho, Pires (2005) identificou, via testes bioquímicos e de PCR, o microrganismo responsável pela deterioração das raízes de mandioquinha e do incremento da atividade pectinolítica como sendo *Erwinia carotovora*. Quando incubada em anaerobiose (no caso, sob acondicionamento a vácuo), a bactéria diminui a sua velocidade de crescimento; no entanto, a produção da enzima Pel duplica nestas condições, justificando o alto grau de amolecimento do tecido (PÉROMBELOM, 2002).

A temperatura é um dos fatores essenciais para o crescimento microbiano e desenvolvimento do apodrecimento-mole. Porém, a temperatura ótima para as

atividades enzimáticas são menores que a temperatura ótima para a multiplicação da bactéria (HASEGAWA et al., 2005; SMADJA et al., 2004) Para *Ecc*, a temperatura ótima para a atividade enzimática de Pel é de 15-17°C, sendo que acima de 24°C, a atividade diminui conforme o aumento da temperatura, apesar da multiplicação bacteriana aumentar. Há uma diminuição de 3 a 6 vezes na atividade da Pel à 30,5°C em comparação a 27°C, apesar da síntese total protéica e da multiplicação microbiana serem similares nas duas temperaturas (SMADJA et al., 2004).

Com o desenvolvimento da técnica de DNA recombinante foi possível conhecer a presença de diversas iso-enzimas produzidas por *Erwinia*. Essa redundância enzimática pode ser ilustrada pelo fato da atividade de Pel em *Ech* ser o resultado acumulativo da ação de pelo menos quatro iso-enzimas, da atividade celulásica de duas enzimas não-relacionadas, e da atividade proteolítica resultado de quatro espécies relacionadas. E ainda, diferentes padrões são encontrados em *Ecc* e *Ech*, que contêm duas endo-Pels periplásmicas e uma exo-Pel periplásmica, respectivamente, que podem contribuir para a patogenicidade por ativar a assimilação de oligômeros derivados do pectato (BARRAS et al., 1994).

As quatro iso-enzimas enzimas Pel de *Ech* são: PelA, PelB, PelC e PelE. Todas as espécies agem de modo endo-lítico, entretanto, a cinética de aparecimento dos produtos de reação sugerem que PelB, PelC e possivelmente PelE podem também agir por um mecanismo exo-lítico. PelB e PelC exibem o mesmo perfil de produtos, formando predominantemente trímeros, e mais raramente dímeros e tetrâmeros. PelE produz principalmente dímeros e quase nenhum trímero. Em contraste, PelA cliva

aleatoriamente resultando em dímeros, trímeros e até oligômeros de alto grau de polimerização. PeIE de *Ech* foi considerada a mais importante na capacidade de maceração, já que mutantes produzidos que não produziam PeIE tiveram a sua maceração reduzida em 50% (BARRAS et al., 1994). Diferentes tipos de iso-enzimas podem ser ativadas sob diferentes condições.

Os oligômeros pécticos podem exercer um importante papel na troca de sinalização entre *Erwinia* pectinolíticas e seus hospedeiros. Oligômeros pécticos com um alto grau de polimerização (10 a 15 resíduos) ativam os sistemas de defesa da planta assim como a síntese de fitoalexinas (compostos antimicrobianos), proteínas relacionadas à patogênese (chitinase, β -glucanase e lignina). Por outro lado, oligômeros de baixo grau de polimerização são preferencialmente usados para a produção de indutores de pectinases. (BARRAS et al., 1994). Assim, o tipo de interação, resistência ou susceptibilidade, podem ser influenciados pelo tipo de oligômero que cerca a bactéria infectante (BARRAS et al., 1994; PALVA et al., 1993; YANG et al., 1992).

O número de enzimas e suas iso-enzimas, provavelmente reflete a complexidade de estruturas pécticas na parede de células vegetais e a variedade de hospedeiros em que as *Erwinia* pectinolíticas podem se desenvolver (YANG et al., 1992).

Apesar da aparente similaridade em sintomas, *Ech* e *Ecc* produzem enzimas extracelulares diferentes em vários aspectos, incluindo características estruturais e sua regulação.

2.5 Processos de conservação de mandioquinha-salsa

Para suprir a demanda de alimentos de uma população mundial crescente, cada vez mais os alimentos devem ser preservados e enviados para diversos países e continentes. Esse fato traz a necessidade de mais e melhores métodos de preservação de alimentos (THAKUR; SINGH, 1995).

Após a colheita, as raízes de mandioquinha-salsa mostram baixa capacidade de conservação, com durabilidade máxima de 6 dias à temperatura ambiente (AVELAR FILHO, 1997; HENZ, 2001; PIRES, 2005).

A utilização de técnicas e/ou práticas de produção que estejam relacionadas a fatores pós-colheita visando ao prolongamento da vida do produto, mantendo, no entanto, sua qualidade é desejada. Técnicas adequadas de proteção ao vegetal são importantes para uma boa produção, bem como para a obtenção de um produto de ótima qualidade, com um bom potencial de armazenamento (ZÁRATE et al., 2001).

Entre as diversas técnicas de preservação de alimentos, com o objetivo de controlar o desenvolvimento microbiano, encontram-se a manutenção de condições atmosféricas desfavoráveis à multiplicação microbiana (embalagens a vácuo, por exemplo); através do uso de temperaturas elevadas; uso de baixas temperaturas; secagem; uso de conservadores químicos; através da irradiação de alimentos entre outros, além da combinação de dois ou mais métodos (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Entre os diversos métodos de conservação, poucos dados foram publicados com relação à mandioquinha-salsa. A seguir serão abordadas as técnicas discutidas na literatura.

2.5.1. Conservadores químicos

Os tratamentos químicos são bastante efetivos quando aplicados na fase pré-colheita, mas, em alguns casos, há a necessidade de tratamento complementar, com medidas de controle pós-colheita. O sucesso do uso destes compostos químicos depende, sobretudo, da aplicação de substâncias que sejam ao mesmo tempo fungistáticas e bactericidas, em doses não fitotóxicas (ZÁRATE et al., 2001).

A maior parte da mandioquinha-salsa consumida no varejo brasileiro é produzida no sistema convencional, que inclui a aplicação de fertilizantes químicos e o uso eventual de agrotóxicos embora não exista nenhum produto químico oficialmente registrado para a cultura no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (AGROFIT, 2008).

Produtos químicos de diferentes classes e com distintos mecanismos de ação têm sido avaliados no controle de *Erwinia*, como antibióticos (kasugamicina, oxitetraciclina, estreptomicina e cefatoxina sódica), fungicidas cúpricos, hipoclorito de sódio, ácido acetilsalicílico, outros compostos bacteriostáticos e desinfetantes (HENZ, 2001). Para o controle de *Erwinia* spp. em hortaliças no Brasil estão registrados no MAPA (Ministério

de Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento) o oxicleto de cobre para a podridão-mole de alface, cenoura, pimentão, batata e brássicas (AGROFIT, 2008; LOPES; HENZ, 1998).

Alguns trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de avaliar a utilização de substâncias químicas no período pós-colheita para aumentar o período de conservação das raízes de mandioquinha-salsa.

Zárate et al. (2001) avaliaram a utilização de oxicleto de cobre. Imediatamente após a colheita, as raízes foram divididas em grupos experimentais e, para o tratamento com desinfecção utilizando oxicleto de cobre, as raízes foram imersas e retiradas imediatamente de uma solução contendo 28g de Funguran 350PM (60% de oxicleto de cobre) em 7,0L de água. As raízes foram embaladas em redes plásticas e mantidas à temperatura ambiente. As menores perdas de peso nas raízes tratadas com oxicleto de cobre mostraram que o produto químico teve algum efeito desinfetante, especialmente no terceiro (15,5%) e quarto (44,5%) dias em relação às perdas nas raízes não tratadas, porém o tratamento não foi efetivo nas condições do experimento, considerando que no quinto dia houve perdas elevadas (71,7%). A ineficácia foi justificada pela utilização de doses baixas do oxicleto de cobre ou pelo curto período de imersão.

Henz (2001) avaliou a ação de antibióticos e de outros produtos comerciais recomendados para a desinfestação ou conservação de alimentos *in vitro* através de antibiogramas em placas de petri com meio de cultura inoculado com células de *Ech*. Foram testados os seguintes produtos e doses: Cítrex (10mL/L); amônio quaternário

(100mL/L); hipoclorito de sódio (20mL/L); cloridrato de kasugamicina (1mL/L); clorafenicol (0,5mL/L); oxitetraciclina (3g/L); oxitetraciclina + estreptomicina (3g/L); dióxido de cloro (4mL/L); oxicleto de cobre + cloreto básico de cobre (2g/L); proteínas bioativas (200mg/L); óxido cuproso (2g/L). Também foram testados outras substâncias com provável ação bacteriostática como: açúcar (10g/10mL); sal (5g/10mL); vinagre (10mL/10mL); calda (partes iguais de açúcar, vinagre e sal), ácido acetilsalicílico (500mg/10mL); *Lactobacillus casei* (sem diluição); extrato de alho (*Allium sativum*, 11,7g/10mL); extrato de semente de sucupira branca (*Bowdichia virgilioides*, 5,8g/10mL); extrato de casca de romã (*Punica granatum*, 13,5g/10mL); extrato de raízes de gengibre (*Zingiber zingiber*, 2,5g/10mL); bicarbonato de sódio (1g/10mL) e óleo mineral (1mL/10mL). Os produtos que apresentaram maior efeito foram oxitetraciclina e oxitetraciclina + estreptomicina, diferindo significativamente entre si e dos demais tratamentos. Os produtos oxicleto de cobre + cloreto básico de cobre, proteínas bioativas e oxido cuproso não diferiram da testemunha (água estéril), não tendo nenhum poder inibitório, os demais tiveram baixo efeito inibitório. Entre as substâncias com provável ação bacteriostática, o extrato de alho foi o melhor tratamento diferindo estatisticamente dos demais produtos e da testemunha. Bicarbonato de sódio, *Lactobacillus casei*, extrato de semente de sucupira, extrato de raízes de gengibre e de casca de frutos de romã não apresentaram nenhum efeito inibitório, e o demais produtos apresentaram baixo poder inibitório.

Para avaliar a ação dos mesmos produtos químicos e substâncias com provável ação bacteriostática *in vivo*, foram mergulhadas raízes de mandioquinha-salsa em baldes contendo os produtos por um período de 3 a 5 minutos, com exceção do dióxido

de cloro e hipoclorito de sódio, que tinham especificado nos respectivos rótulos períodos de 5 e 10 minutos respectivamente. Depois do tratamento, deixou-se escorrer o excesso de água durante 10-15 minutos, acondicionando as raízes em sacos plásticos durante 3 dias a temperatura ambiente (22-27°C). Foram feitas avaliações diárias, verificando a presença de lesões. Clorafenicol, hipoclorito de sódio, cloridrato de kasugamicina, oxitetraciclina, oxitetraciclina + estreptomicina foram os produtos que provocaram redução na incidência de deterioração, diferindo estatisticamente do controle (somente lavado com água). A calda preparada com açúcar foi o único tratamento que diferiu do controle, porém houve alteração de cor e aparência das raízes. Os demais não reduziram a incidência de deterioração.

2.5.2. Refrigeração

O parâmetro temperatura é um dos fatores extrínsecos mais importantes na atividade bioquímica dos microrganismos. Quanto menor for a temperatura, menor será a velocidade das reações bioquímicas ou a atividade microbiana (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

De fato, Scalon et al. (2002b) conseguiram aumentar o período de conservação de raízes de mandioquinha-salsa em até 112 dias, utilizando embalagem e refrigeração. Nesse trabalho, as raízes foram lavadas manualmente logo após a colheita. O armazenamento foi feito em temperatura ambiente ($35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 80%

umidade relativa) e sob refrigeração ($5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 70% umidade relativa) em embalagem plástica CF film contendo absorvedor de etileno, perfurada e não perfurada e sem embalagem, avaliando-se a perda de massa fresca e aspecto geral. As raízes embaladas apresentaram menor perda de massa fresca, provavelmente em virtude da manutenção da umidade relativa, a qual associada à refrigeração reduziu a atividade metabólica tecidual e, conseqüentemente a taxa de respiração e transpiração. Nenhuma das raízes embaladas com ou sem perfuração e sob refrigeração apresentou sintomas de apodrecimento.

Henz (2001) também avaliou a influencia da refrigeração sobre a conservação de mandioquinha-salsa. Em seu estudo, as raízes foram acondicionadas em sacos plásticos fechados e mantidas em câmaras frias em 3 temperaturas diferentes (5°C , 15°C e 25°C , $\pm 2^{\circ}\text{C}$), avaliando-se diariamente por um período de 6 dias a presença de lesões de apodrecimento-mole. Ao final do período, somente 4% das raízes apresentaram deterioração na temperatura de 5°C , enquanto 100% das raízes armazenadas a 25°C encontravam-se deterioradas.

Porém, como muitos vegetais tropicais e subtropicais, a mandioquinha-salsa é sensível a baixas temperaturas, mostrando sinais de escurecimento interno e externo quando armazenado a 5°C . Ribeiro et al. (2005) avaliaram os danos às raízes expostas à duas temperaturas (5°C e 10°C). A 10°C , as raízes apresentaram alguns sintomas visuais de lesão após 14 dias, mas era um escurecimento leve, enquanto que as raízes armazenadas a 5°C tiveram lesões leves após 7 dias, moderadas aos 14 e severas depois de 28 dias.

Os principais sintomas de sensibilidade ao frio são esparsas lesões superficiais, caracterizadas por depressões, seguida por intenso escurecimento dos tecidos ao redor da lesão. Internamente há o escurecimento do tecido vascular. Raízes com lesões severas podem ter uma aparência de mofo cinza que se estende do anel vascular até a periderme (RIBEIRO et al., 2005).

2.5.3. Embalagem

Entre as técnicas utilizadas para a preservação de alimentos com o objetivo de prevenir ou diminuir o crescimento microbiano se encontram a utilização de embalagens.

É possível estender a vida pós-colheita das raízes de mandioquinha associando-se baixas temperaturas e embalagens adequadas, como filmes de PVC e embalagens a vácuo por exemplo, podendo alcançar até 30 dias (HENZ; REIFSCHNEIDER, 2005).

Ribeiro et al. (2007) avaliou a utilização de filmes de cloreto de polivinila (PVC) associado a duas temperaturas de refrigeração (5 e 10°C) para a conservação de raízes de mandioquinha-salsa, avaliando o aparecimentos de lesões por frio durante um período de 60 dias. Neste estudo observou-se que a perda de massa após 60 dias foi maior no armazenamento a 5°C do que a 10°C, sendo que a utilização do filme de PVC diminuiu a perda de massa de 58,9% para 8,8% quando armazenado em 5°C, enquanto que a 10°C foi de 31,9% para 3,5%. Acredita-se que o filme reduziu o

gradiente de pressão de vapor e, conseqüentemente, diminuiu a perda de água da raiz. Não houve o desenvolvimento de danos visíveis causados por frio nas raízes armazenadas por 60 dias quando embaladas com filme de PVC. Não foi avaliada a presença de lesões de apodrecimento-mole causadas por *Erwinia*.

Scalon et al. (2002b) avaliaram a perda de matéria fresca com raízes conservadas em embalagem plástica CF film (embalagem plástica contendo um absorvente de etileno), com e sem perfuração, em temperatura ambiente e sob refrigeração, e observou-se que as perdas de massa foram menores na conservação com embalagens sem perfurar e sob refrigeração, se mantendo até 112 dias viáveis para análise, enquanto que as sem embalagem se encontravam imprestáveis após 56 dias de armazenamento.

Em outro estudo, Scalon et al. (2002a) avaliaram o efeito da embalagem CF film e do filme de PVC na conservação sob refrigeração das raízes de mandioquinha. Foi observada uma menor perda de massa nas raízes armazenadas com CF film, porém as embaladas com PVC apresentavam-se com aparência apropriada para comercialização ao final dos 126 dias de conservação. Apesar dos autores concluírem que as raízes podem ser armazenadas por um período prolongado, não foram realizadas análises quanto a presença de lesões por apodrecimento-mole.

A eliminação do oxigênio das embalagens, que pode ser obtido pela modificação da atmosfera ou pela produção de vácuo, tem como objetivo prevenir o crescimento de microrganismos aeróbios estritos e reduzindo o crescimento dos aeróbios facultativos

através da restrição da quantidade de energia que pode ser obtida pelo substrato utilizado (GOULD, 1996).

Henz (2001) avaliou o efeito de quatro combinações de embalagens com atmosfera modificada, com diferentes níveis de oxigênio e dióxido de carbono, na conservação a temperatura ambiente. Foi observado um efeito significativo sobre a incidência de podridão-mole após três dias de incubação, onde a deterioração foi de 15,8% nas amostras mantidas em atmosfera normal (controle), e variou de 41,2% a 83,3% para as três combinações de gases, sendo que a que apresentou maior deterioração foi a amostra contendo 1% CO₂ + 1% O₂.

2.5.4. Irradiação

A irradiação é a aplicação de energia ionizante a um material específico com a finalidade de aumentar a estabilidade de armazenamento através da redução da população de microrganismos, da eliminação de parasitas ou insetos, ou o bloqueio da atividade enzimática (ANDREWS et al., 1998).

A irradiação tem sido considerada como uma tecnologia segura por mais de 40 países para reduzir o número de microrganismo em alimentos como parte da produção, processamento, manuseio e preparação dos alimentos de alta qualidade (ADA, 2000).

A FAO/WHO considera que alimentos irradiados produzidos sob “boas praticas de manufatura” (BPM) devem ser considerados seguros e nutricionalmente adequados incondicionalmente quando utilizadas doses abaixo de 10kGy em função de: (1) o processo de irradiação não irá introduzir mudanças na composição do alimento, no qual, de um ponto de vista toxicológico, irá impor um efeito adverso a saúde humana; (2) o processo de irradiação não irá introduzir mudanças na microflora do alimento que poderia aumentar o risco microbiológico ao consumidor, (3) o processo de irradiação não irá induz a perda de nutrientes na composição de alimentos que, de um ponto de vista nutricional, irá impor um efeito adverso no status nutricional de indivíduos ou populações (ADA, 2000; THAKUR; SINGH, 1995).

O tratamento de alimentos com energia ionizante oferece vários benefícios aos consumidores, entrepostos e fabricantes. Certamente o benefício mais importante é o aumento da qualidade microbiológica dos alimentos. Outros benefícios incluem a substituição de tratamentos químicos e o aumento de vida de prateleira (ADA, 2000).

Como a irradiação não aumenta substancialmente a temperatura dos alimentos, as perdas nutricionais são pequenas e, freqüentemente, são menores do que em comparação a outros métodos de preservação como secagem, enlatados, pasteurização e esterilização. Em geral, nutrientes mais sensíveis a tratamentos térmicos, como vitaminas, também são sensíveis a irradiação. Mas a perda de nutrientes pode ser minimizada pela irradiação de alimentos em ambientes livres de oxigênio ou em estado congelado (ADA, 2000).

A irradiação de alimentos utiliza uma fonte de energia ionizante que passa através do alimento para destruir bactérias nocivas e outros organismos. As fontes de energia ionizante podem ser raios gama do cobalto (^{60}Co), cério (^{137}Cs), raios-X ou elétrons gerados através de aparelhos. Os raios gama emitidos são de baixo comprimento de onda, similares a luz ultravioleta e microondas. Como a radiação gama não emite nêutrons (ou seja, partículas subatômicas que podem tornar as substâncias radioativas), alimentos irradiados e suas embalagens não se tornam radioativos (ADA, 2000).

O Sistema Internacional de Unidades desenvolveu o termo Gray (Gy) para referir a quantidade de energia absorvida por um material quando irradiado. Em termos de energia, um Gray é definido como “dose de um joule por quilograma do material absorvente” (ANDREWS et al., 1998).

A penetração da energia é cerca de 3,8cm, assim a espessura dos itens tratados é limitado a 7,6cm, com tratamento de ambos os lados. A energia penetra no alimento e na embalagem, mas a maior parte simplesmente atravessa o alimento, similar ao modo em que a microonda passa, não deixando resíduos. A pequena quantidade de energia que não atravessa o alimento é negligenciável e é retida como calor. O período de duração da exposição da energia ionizante, a densidade do alimento e a quantidade de energia emitida pelo irradiador determinam a quantidade ou dose de energia radiante ao qual o alimento é exposto. Doses regulamentadas são estabelecidas em níveis mínimos necessários para alcançar os propósitos especificados ou benefícios (ADA, 2000).

A dose de irradiação a ser dada ao alimento é determinada pelo efeito desejado: altas doses, maiores que 10kGy, são destinadas para a esterilização de alimentos; doses médias, de 1 a 10 kGy, exercem um efeito de pasteurização aumentando a vida de prateleira; e baixas doses, menores de 1kGy, controlam efetivamente a infestação por parasitas e insetos, e diminuem o processo de senescência na maioria das frutas frescas e o brotamento de vegetais (Andrews et al., 1998). Porém, na prática, a dose máxima é estabelecida tendo como base o aparecimento de mudanças indesejáveis nas características sensoriais (KILCAST, 1991).

Mudanças na textura por quebra de carboidratos é um dos principais determinantes da dose a ser empregada na irradiação de vegetais. A degradação de carboidratos como celulose, pectina e amido leva ao amolecimento, que geralmente não é desejável (URBAIN, 1986; KILCAST, 1991) Tal degradação pode enfraquecer a rígida estrutura dos tecidos ou alterar paredes celulares reduzindo o turgor. E ainda, mudanças nos tecidos podem liberar enzimas endógenas em locais em que irão atacar os carboidratos, ou as mudanças nos carboidratos pode torná-los mais susceptíveis ao ataque enzimático (KILCAST, 1991).

A combinação de tratamentos de conservação de alimentos pode levar à redução das doses utilizadas, e, portanto, à redução de mudanças indesejadas. (THAKUR; SINGH, 1995). Porém, bactérias que participam de processos deteriorantes são mais resistentes à irradiação do que as patogênicas (que causam doenças alimentares), e requerem doses maiores (ADA, 2000).

De acordo com a intensidade da dose aplicada, foram atribuídas nomenclaturas para cada objetivo específico. A *radurização* refere-se ao tratamento de alimentos com radiação ionizante suficiente para aumentar a vida de prateleira por reduzir o número inicial de microrganismos deteriorantes antes ou imediatamente após a embalagem. A dose utilizada varia de acordo com cada alimentos, mas é uma baixa dose. A *radicidação* é o tratamento que reduz suficientemente o nível de patógenos não formadores de esporos, incluindo parasitas, a um nível não detectável, e assim reduzindo o risco de doenças alimentares à praticamente zero, sendo geralmente uma dose de nível médio. E a *radapertização* é o nível mais alto de radiação, utilizado para alcançar a esterilidade do alimento. Esse processo permite uma estabilidade de armazenamento em temperatura ambiente equivalente ao enlatamento ou a utilização de “embalagens assépticas”. São necessárias doses maiores de 10kGy (ANDREWS et al., 1998).

Doses de 100Gy foram recomendadas para a radurização de mandioquinha-salsa, dobrando o tempo de conservação a 22°C. (URBAIN, 1986). Seguindo essa linha, um estudo piloto foi realizado por Pires (dados não publicados) em pequeno número de amostras para se verificar o efeito de diferentes doses de irradiação (0,1, 1,0 e 10,0 kGy) em raízes de mandioquinha-salsa, embaladas a vácuo. As raízes foram analisadas por meio da determinação da firmeza e energia de penetração, e de observação macroscópica do estado de deterioração. Os resultados mostraram que nas raízes irradiadas em doses baixas (0,10 kGy) o efeito pretendido da irradiação não foi observado: não apresentaram diferença de comportamento em relação ao grupo controle de raízes não irradiadas. Em doses altas (10,0 kGy), as raízes aparentaram

alto grau de deterioração: coloração amarronzada e com textura similar à da mandioquinha cozida. Todavia, as raízes irradiadas a 1,0 kGy apresentaram melhor nível de conservação, mantendo-se praticamente intactas durante os cinco dias de armazenamento a vácuo, em estufa controlada a 25°C. Neste caso, fica aparentemente reforçada a possibilidade de que o efeito-degradação das raízes decorra, principalmente, da ação microbiana, posto que a irradiação é bastante eficiente quanto a este aspecto.

Em estudo semelhante, raízes de mandioquinha-salsa minimamente processadas (lavadas, descascadas, cortadas e embaladas em filmes de polietileno) foram irradiadas no CENA (Centro de Energia Nuclear da Agricultura), em Piracicaba, a uma dose de 2 kGy. A radiação gama preservou as propriedades físico-químicas das raízes, como cor e umidade, de extrema importância em se tratando de um produto fresco. Além disso, não foram observadas alterações de sabor, determinada através de análise sensorial com painel de provadores treinados. As contagens de bolores e leveduras das amostras irradiadas mantiveram-se baixas até o 14º dia de armazenamento, ao contrário das amostras não-irradiadas que neste período apresentaram um alto grau de deterioração (IEMMA, 2001).

A irradiação das raízes de mandioquinha pode vir a ser uma alternativa para o aumento de sua vida-de-prateleira, principalmente visando à exportação para centros não produtores da parte comestível da planta, hoje inviável em função de sua alta perecibilidade. O aumento do período conservação através do emprego da irradiação pode promover a redução dos custos de transporte e armazenamento, principalmente

em relação ao uso de refrigeração e embalagem uma vez que a irradiação pode atingir os tecidos internos contaminados, destruindo microrganismos eventualmente presentes. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – com a resolução RDC nº21, de 26 de janeiro de 2001, aprovou um regulamento técnico para a irradiação de alimentos com a finalidade de controle fitossanitário e zoonosário. Entretanto, a resolução não estabelece doses de irradiação permitidas para cada tipo de alimento (ANVISA, 2001). Segundo a Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), doses médias de irradiação, entre 1 e 10 kGy, podem ser utilizadas para a redução do número de microrganismos deteriorantes, redução de número ou eliminação de patógenos não-formadores de esporos, e portanto, de doenças causadas por microrganismos e aumento de vida-de-prateleira (ICGFI, 1999). Porém, a irradiação de alimentos pode causar mudanças indesejáveis no sabor, aparência e textura, tornando o produto não adequado ao consumo humano. A irradiação pode afetar principalmente a textura de leguminosas. Por esta razão, avaliações de mudanças de características organolépticas, através de análise sensorial, e combinação de técnicas de conservação devem ser estudadas. A utilização de doses menores de radiação ionizante, embalagens e baixas temperaturas são normalmente empregadas (KILDCAST, 1991).

3. Objetivos

3.1. Geral

Avaliar o efeito da utilização de três processos de conservação de alimentos – irradiação, embalagem e temperatura - na conservação de raízes de mandioquinha-salsa, utilizando parâmetros microbiológicos, de textura e perfil enzimático ao longo do tempo.

3.2. Específicos

- a) Irradiar as raízes de mandioquinha-salsa e armazená-las sob diferentes condições, com o objetivo de prolongar seu período de conservação;
- b) Estudar a carga microbiana das raízes durante o período de estocagem nas condições determinadas;
- c) Isolar microrganismos pectinolíticos, incluindo os do gênero *Erwinia*, presentes nas amostras;
- d) Verificar a atividade das enzimas pectinesterase, poligalacturonase e pectato liase dos extratos das raízes de mandioquinha-salsa, durante o período de armazenamento;
- e) Verificar as alterações de firmeza (textura) das raízes durante o armazenamento, em decorrência da atividade de enzimas pectinolíticas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Composição química

4.1.1. Material

Raízes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Cv. *Amarela comum*) foram adquiridas no comércio local no dia das análises. As raízes foram lavadas em água corrente, secas em papel absorvente, cortadas em rodela finas, e por fim, congeladas em sacos plásticos a -20°C.

4.1.2. Métodos

4.1.2.1. Umidade

A umidade foi determinada através da diferença de peso (gravimetria) antes e depois do processo de liofilização das rodela de mandioquinha-salsa. O resultado foi expresso em % de peso (g) (AOAC, 1985). Depois de secas, as rodela foram trituradas e homogeneizadas em moinho analítico para serem determinados o conteúdo de cinzas, proteína, lipídeos e fibras.

4.1.2.2. Cinzas

As cinzas foram determinadas por gravimetria através da incineração das amostras em mufla a 550°C (AOAC, 1985), com prévia queima do material em chapa aquecida. O resultado foi expresso em % de peso (g).

4.1.2.3. Proteína

Para a quantificação das proteínas foi utilizado o método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1985) com digestão ácida utilizando sulfato de cobre como catalisador. Foi utilizado 6,25 como fator de conversão de nitrogênio. O resultado foi expresso em % de peso (g).

4.1.2.4. Lipídeos

Foi utilizado o método de Soxhlet (AOAC, 1985) para a extração do material lipídico, que foi quantificado por gravimetria. Foi utilizado éter etílico como solvente de extração. O resultado foi expresso como % de peso (g).

4.1.2.5. Fibras

Para a determinação da fibra alimentar total foi utilizado o método enzimico-gravimétrico (CASTRO et al., 2004). O método se baseia na determinação do peso do resíduo (fibra alimentar insolúvel), resultante da eliminação de amido e proteína através da hidrólise enzimática, seguida da precipitação da fibra alimentar solúvel em etanol 78%. O conteúdo de fibra alimentar total foi obtido através da soma dos dois resíduos, solúvel e insolúvel, e todos os resultados foram expressos em % de peso (g).

4.2. Ensaio preliminar

4.2.1. Material

Raízes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Cv. *Amarela comum*) foram adquiridas no CEAGESP, um dia após a colheita, a granel e embaladas a vácuo pelo próprio fornecedor, em filmes de nylon-polietileno e com pressão de

vácuo de 70mmHg. As raízes que se encontravam soltas foram agrupadas em sacos plásticos, com peso médio de 500g, para a irradiação dos grupos.

As amostras foram irradiadas na planta piloto da EMBRARAD, Empresa Brasileira de Radiações, utilizando fonte de ^{60}Co , em temperatura ambiente. Foram aplicadas três doses de irradiação: 1, 2 e 3kGy, sendo que as amostras controle não foram irradiadas. O sistema dosimétrico utilizado foi o PMMA (polimetilmetacrilato), com dosímetros da marca Harwell Dosimeters, tipo Amber Perspex.

As raízes foram mantidas em duas temperaturas diferentes, em câmara fria (4°C) e a temperatura ambiente (20 a 25°C).

Dessa forma foram analisados os seguintes grupos de raízes:

Quadro 1 – Delineamento experimental do ensaio preliminar.

Nº	Embalagem	Irradiação	Temperatura
1	Saco plástico aberto	-	25°C
2	Saco plástico aberto	-	4°C
3	Vácuo	-	25°C
4	Vácuo	-	4°C
5	Saco plástico aberto	1kGy	25°C
6	Saco plástico aberto	1kGy	4°C
7	Vácuo	1kGy	25°C
8	Vácuo	1kGy	4°C
9	Saco plástico aberto	2kGy	25°C
10	Saco plástico aberto	2kGy	4°C
11	Vácuo	2kGy	25°C
12	Vácuo	2kGy	4°C
13	Saco plástico aberto	3kGy	25°C
14	Saco plástico aberto	3kGy	4°C
15	Vácuo	3kGy	25°C
16	Vácuo	3kGy	4°C

4.2.2. Métodos

Diariamente as amostras foram avaliadas segundo os parâmetros: firmeza das raízes, pontos de apodrecimento, amolecimento da raiz, produção de exsudado e perda de vácuo (para as amostras embaladas a vácuo). Todos os parâmetros foram registrados diariamente para acompanhamento da deterioração das raízes, e foram tiradas fotos diárias de todas as amostras. Para a avaliação das amostras, todas as raízes eram manipuladas, fazendo uma leve pressão com os dedos ao longo de todo o tubérculo, para a contagem de pontos de apodrecimento e avaliação da firmeza.

O grupo foi considerado impróprio quando visivelmente continha muitos pontos de apodrecimento (>15 por grupo), mais do que a metade das raízes do grupo estavam moles e/ou o acúmulo de exsudado excessivo. Foi considerado um acúmulo excessivo de exsudado quando o volume de líquido atingisse 1/5 da embalagem.

4.3. Ensaio de conservação

4.3.1. Material

Raízes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Cv. *Amarela comum*) foram adquiridas, em dois momentos (conforme o calendário demonstrado abaixo), no CEAGESP, um dia após a colheita, a granel e embaladas a vácuo pelo próprio fornecedor, em filmes de nylon-polietileno e com pressão de vácuo de 70mmHg. As raízes a granel foram separadas em caixas (22x16x5cm) de papelão perfuradas, agrupadas duas a duas, para se aproximar ao armazenamento do CEAGESP.

Foi elaborado um cronograma de análise utilizando dois lotes de amostras com mesmo tempo de colheita adquiridos em dias diferentes conforme exemplificado no quadro 2 abaixo:

Quadro 2 – Calendário da coleta de amostras para o ensaio de conservação no período de fevereiro/março de 2008:

Domingo	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta	Sábado
				7	8 1º dia	9
10	11	12 5º dia	13 6º dia	14 7º dia	15 8º dia	16
17	18	19	20 2º dia e 13º dia	21 3º dia e 14º dia	22 4º dia	23
24	25	26 19º dia	27 9º dia e 20º dia	28 10º dia e 21º dia	29 11º dia	1 12º dia*
2	3	4 15º dia e 26º dia	5 16º dia e 27º dia	6 17º dia e 28º dia	7 18º dia	8
9	10	11 22º dia	12 23º dia	13 24º dia	14 25º dia	15

Os dias de retirada das amostras no CEAGESP estão marcados com um balão no formato de estrela. Dias de ensaio de mesma cor significam que foram obtidos no mesmo lote.

As amostras foram irradiadas na planta comercial da EMBRARAD, utilizando fonte de ^{60}Co , na temperatura ambiente. Foram aplicadas três doses de irradiação: 1, 2 e 3kGy, sendo que as amostras controle não foram irradiadas. O sistema dosimétrico utilizado foi o PMMA (polimetilmetacrilato), com dosímetros da marca Harwell Dosimeters, tipo Amber Perspex.

As amostras foram armazenadas por um período de 30 dias em duas condições de temperatura controlada, em câmara fria a 4°C e em B OD a 25°C.

Dessa forma foram analisados os seguintes grupos de raízes:

Quadro 3 – Delineamento experimental do ensaio de conservação.

Nº	Embalagem	Irradiação	Temperatura	Código
1	Caixa papelão	-	25°C	25CC
2	Caixa papelão	1kGy	25°C	25C1
3	Caixa papelão	2kGy	25°C	25C2
4	Caixa papelão	3kGy	25°C	25C3
5	Caixa papelão	-	4°C	4CC
6	Caixa papelão	1kGy	4°C	4C1
7	Caixa papelão	2kGy	4°C	4C2
8	Caixa papelão	3kGy	4°C	4C3
9	Vácuo	-	25°C	25VC
10	Vácuo	1kGy	25°C	25V1
11	Vácuo	2kGy	25°C	25V2
12	Vácuo	3kGy	25°C	25V3
13	Vácuo	-	4°C	4VC
14	Vácuo	1kGy	4°C	4V1
15	Vácuo	2kGy	4°C	4V2
16	Vácuo	3kGy	4°C	4V3

Durante o período de estocagem, foram retiradas amostras diariamente para análises de textura, testes microbiológicos e isolamento das bactérias pectinolíticas, e extração e determinação da atividade enzimática pectinolítica (enzimas pectinesterase, poligalacturonase e pectato liase).

4.3.2. Métodos

4.3.2.1. Textura

Durante o período de armazenamento, uma raiz de cada grupo foi analisada por dia para a determinação da firmeza, medida por texturômetro SMS (modelo TAXT2i, Stable Micro System, England), equipado com o *probe* P/2N (formato agulha). Foram avaliadas em 5 pontos diferentes, na qual o *probe* perfura perpendicularmente a raiz

por uma distância de 20mm.

A energia de penetração (J) foi calculada através da medida da área dos gráficos de distância de penetração (mm) *versus* a medida de força de penetração ou firmeza (N) das raízes.

4.3.2.2. Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), sob a supervisão da professora Dra. Mariza Landgraf, que coordena projetos relacionados à redução da carga microbiana de alimentos por meio do uso de irradiação

4.3.2.2.1. Contagem Total de Microrganismos Mesófilos

Para verificar o efeito da irradiação gama na redução da população de microrganismos mesófilos causadores da podridão-mole nas raízes, foram feitas análises todos os dias durante o período de armazenamento.

Para a realização da semeadura, foram utilizadas 10g de amostra em 90mL de água peptonada 0,1% estéril, e o material foi homogeneizado no aparelho Stomacker® por 60 segundos. Foram realizadas diluições seriadas utilizando água destilada estéril como diluente. Um volume de 100µL da diluição final foi semeado em meio Ágar Nutriente (AN), que é um meio não seletivo de isolamento microbiano, utilizando a alça de Drigalsky para a semeadura em superfície. As placas foram incubadas por 48h a 25°C, em aerobiose (a bactéria é anaeróbia facultativa), para posterior contagem das colônias de microrganismos. Os resultados estão apresentados em unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de alimento.

4.3.2.2.2. Isolamento de bactérias pectinolíticas

Para o isolamento de bactérias pectinolíticas, incluindo as do gênero *Erwinia*, foram utilizados pimentões verdes como meio parcialmente seletivo (TAKATSU et al., 1981). A partir da placa de AN, as colônias foram inoculadas em frutos de pimentão verde

com o auxílio de palitos de dente estéreis, que foi identificado com o código do grupo e o dia da análise. O fruto de pimentão foi mantido a 25°C, em bandejas plásticas fechadas com filme de PVC, por 48h. A identificação positiva para a bactéria é a formação de lesão de podridão-mole no local inoculado. Os isolados foram conservados em tubos tipo eppendorf com água esterilizada, mantidas a temperatura ambiente, ao abrigo da luz (LIAO; SHOLLENBERGER, 2003).

4.3.2.2.3. Capacidade relativa de maceração dos isolados

Para avaliar a capacidade de maceração das bactérias pectinolíticas isoladas das amostras de mandioquinha-salsa foi utilizado o método utilizado por Henz (2001) com adaptações. A partir dos isolados conservados em água estéril, foi transferido 100µL para meio BHI (Brain-heart infusion) e incubado por 16 horas a 25°C. Para estimar a população bacteriana, utilizou-se espectrofotômetro UV no comprimento de onda 580nm contra uma curva de crescimento previamente estabelecida. Frutos de pimentão verde, previamente lavados em água corrente e esponja macia, tiveram sua superfície higienizada com algodão contendo álcool 70%. Os frutos foram dispostos em bandejas plásticas, e com o auxílio de um palito de dente estéril foram feitas lesões para a inoculação de 10µL das culturas contendo 10^8 UFC. As bandejas foram fechadas em sacos plásticos identificados e incubadas a 25°C por 48h. As lesões tiveram suas dimensões medidas com o auxílio de um paquímetro digital. Para o cálculo da área foram mensuradas o raio maior e menor da lesão (formato elíptico).

A curva de crescimento foi estabelecida fazendo diluições seriadas em água estéril da cultura de vários isolados, e semeadura em meio AN, com incubação por 48h a 25°C. Foi lida a absorbância da cultura inicial em espectrofotômetro a 580nm. Após a contagem total das bactérias e o cálculo da população (UFC), foi elaborado um gráfico da absorbância *versus* a contagem total microbiana.

4.3.2.3. Atividade das enzimas pectinolíticas

4.3.2.3.1. Extração e detecção de pectinesterase (PME) e poligalacturonase (PG)

O método de extração das enzimas é baseado no protocolo desenvolvido por Pires e Finardi-Filho (2005). Cerca de 10 g de amostra foram homogeneizadas com 10 mL de NaCl 1,0 M no homogeneizador Ultra Turrax, por 3 min. Após a trituração, o pH do homogenato foi ajustado para 4,0 (extração de poligalacturonase) ou para 7,5 (para a pectinesterase) mediante a adição de NaOH 3,0 M ou de ácido acético 2,0 M. O homogenato foi agitado continuamente a 4°C, durante 4h. Após a centrifugação a 10.000 x g, por 30 min, a 4°C, o sobrenadante, denominado extrato enzimático, foi armazenado a -20°C até o dia da análise.

A atividade PG foi medida de acordo com os métodos descritos por Gross (1982) e Honda et al. (1982). Os métodos baseiam-se na liberação hidrolítica de grupos redutores, a partir do ácido poligalacturônico. Uma solução contendo 5µL de extrato enzimático em 45 µL em tampão acetato de sódio 37,5 mM, pH 4,4, foi incubada com 150 µL do mesmo tampão, contendo 0,2% da ácido poligalacturônico, a 30° C, por 2 h. Para a quantificação dos grupos redutores formados, a reação foi interrompida através da adição de 1,0 mL de uma solução de tampão borato, 100mM gelado, pH 9,0, seguido da adição de 0,2 mL de 2-cianoacetamida 1%. As amostras foram agitadas e imersas em banho de água fervente por 10 min. Após o resfriamento, a quantidade de açúcares redutores formada foi medida no comprimento de onda 276 nm contra o branco de reação. O branco de amostra consistiu em um tubo contendo o extrato enzimático nas mesmas proporções da amostra fervido previamente por 10 minutos. Já no branco de reação foi substituído o extrato enzimático por água destilada. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi expressa por 1,0 nmol de ácido galacturônico produzido x mg proteína⁻¹ x h⁻¹.

A atividade enzimática de PME foi determinada pelo método de quantificação de metanol formado (KLAVONS; BENNETT, 1986). Uma alíquota de extrato enzimático (150µL) foi adicionado a 100µL de uma solução contendo 100mM de tampão de fosfato de sódio, pH 6,5 e 1% de pectina cítrica. A mistura de reação foi incubada a 25°C, por 15 minutos. Para parar a reação, a amostra foi levada a banho fervente por 3 minutos, e posteriormente resfriada em água corrente. Foi adicionado 2,0mL de tampão Tris-HCl, 20mM, pH 7,5 contendo 1 U de álcool oxidase (Sigma®), e incubado por 15 minutos a 25°C. Por fim, foi adicionado 1,0mL de uma solução contendo 2,4-pentandiona (Sigma®), 20mM, e fosfato de amônia, 2M, e incubado por 15 minutos a 60°C. Ao final do tempo de incubação as amostras foram resfriadas em água corrente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 412nm contra o branco de reação, utilizando uma curva de calibração de metanol como padrão. O branco de amostra consistiu em um tubo contendo o extrato enzimático nas mesmas proporções da amostra fervido previamente por 10 minutos. Já no branco de reação, foi substituído o extrato enzimático por água destilada. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi expressa por $1,0\mu\text{g Metanol} \times \text{mg de proteína}^{-1} \times \text{h}^{-1}$.

4.3.2.3.2. Extração e detecção de pectato liase (PeL)

A pectato liase foi extraída das raízes de mandioquinha através da homogeneização do tecido com tampão glicina-NaOH, 50 mM, pH 8,6, (1:1, m/v) em homogeneizador Ultra Turrax, por 3 min. Após a centrifugação a $9.000 \times g$, durante 30 min a 4°C, o material decantado foi desprezado e o sobrenadante, chamado de extrato enzimático, foi armazenado a -20°C para posterior análise.

A atividade enzimática foi determinada segundo o método descrito por Di-Pietro e Roncero (1996). A mistura de reação consiste na incubação de 20µL de extrato enzimático com 1,0mL de solução contendo 0,2% de ácido poligalacturônico em tampão glicina-NaOH 50 mM, pH 9,5 e 5 mM de CaCl_2 , por 30min, a 40°C. Os grupos redutores foram quantificados segundo o método de Gross (1982) e Honda et al.

(1982), pela adição de 200µL da mistura com 1,0mL de uma solução fria de tampão borato, 100mM, pH 9,0, seguido da adição de 0,2mL de 2-cianoacetamida 1%. Após 10 minutos de incubação em água fervente, e resfriamento, a quantidade de açúcares redutores formada foi medida em comprimento de onda de 276 nm contra o branco. O branco de amostra consistiu em um tubo contendo o extrato enzimático nas mesmas proporções da amostra fervido previamente por 10 minutos. Já no branco de reação foi substituído o extrato enzimático por água destilada. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi expressa por 1,0nmol de ácido galacturônico produzido x mg proteína⁻¹ x h⁻¹.

4.3.2.3.3. Teor de proteínas

As proteínas presentes nos extratos enzimáticos foram quantificadas pelo método descrito por Bradford (1976), comprimento de onda de 595 nm, utilizando a albumina sérica bovina como padrão.

4.4. Análise estatística

Os experimentos foram realizados de forma inteiramente casualizada e todos os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (testes de Levene e Brown-Forsythe).

Na constatação de que foram satisfeitas as condições para aplicação dos testes estatísticos paramétricos de comparação de médias, as seguintes análises estatísticas foram realizadas:

- a) Nas análises de textura e enzimas (PG, PEL e PME) a influência do tempo (dias) e das embalagens (caixa e vácuo), temperaturas (4°C e 25°C) e irradiação (0, 1, 2 e 3kGy) foi avaliada pela Análise de Variância Bidimensional (Two-way ANOVA) seguida do teste Tukey;

b) Na análise de microbiologia, a influência das embalagens e temperaturas foi avaliada utilizando-se o teste t de Student e a influência da irradiação foi avaliada pela Análise de Variância Unidimensional (One-way ANOVA) seguida do teste Tukey;

c) Na análise dos isolados de bactérias pecnolíticas foi utilizado o teste qui-quadrado (presença/ ausência) para avaliar a frequência de bactérias isoladas nos diferentes grupos.

Nos conjuntos de dados em que não foram observadas distribuição normal e, principalmente, a homogeneidade das variâncias, testes estatísticos não-paramétricos foram adotados. Para comparação de dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney e para mais de dois grupos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis.

Os resultados foram expressos como média dos resultados (desvio padrão). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa STATISTICA 8.0 e adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Composição química

Foi determinada a composição química de raízes de mandioquinha-salsa com o objetivo de caracterização do alimento a ser estudado, e comparação com a literatura existente.

Os resultados das análises de composição química de raízes de mandioquinha-salsa encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição química da mandioquinha-salsa

	Média (desvio padrão)	Valores de referência***
% Umidade (n=6)	74,11 (1,04) ^a	75,59 ^b
% Cinzas (n=3)	4,90 (0,11)	
% Proteína (n=3)	2,44 (0,09) ^a	3,35 ^b
% Lipídeos (n=3)	0,59 (0,05)	
% Fibras totais	5,06 ^a	4,69 ^a
%Fibras solúveis (n=4)	-*	
% Fibras Insolúveis (n=4)	5,06 (0,51)	
% Carboidratos	17,96 ^{**}	19,01

Os dados foram expressos em base seca. Sobrescritos diferentes correspondem a resultados significantemente diferentes ($p < 0,05$);

*valor abaixo da capacidade de detecção do método

**valor determinado por diferença

***CÂMARA, 2002.

Vários fatores podem ser levantados para explicar diferenças na composição química de um alimento, entre eles podemos ressaltar que há uma grande influência do solo em que foram cultivados, o clima da região de cultivo, à época do ano. Além disso,

metodologias diferentes de análise podem também levar a pequenas diferenças. No entanto, os valores médios, apesar de serem diferentes estatisticamente, apresentam muita semelhança com aqueles da referência, e para uma avaliação mais detalhada, os ensaios deveria ser realizados lado a lado.

5.2. Ensaio preliminar

O objetivo do ensaio foi a determinação do tempo de conservação das raízes após os tratamentos (embalagem, irradiação e temperatura), utilizando uma escala arbitrária já descrita anteriormente, possibilitando assim o planejamento dos ensaios de conservação subseqüentes.

A análise visual das amostras encontra-se descrita nas Figuras 6, 7, 8 e 9.

Figura 6 – Raízes de mandioquinha-salsa armazenadas a 25°C, em sacos plásticos abertos, com diferentes doses de irradiação.

Figura 7 – Raízes de mandioquinha-salsa armazenadas a 25°C, a vácuo, com diferentes doses de irradiação.

Figura 8 – Raízes de mandioca-salsa armazenadas a 4°C, em sacos plásticos abertos, com diferentes doses de irradiação.

Figura 9 – Raízes de mandioca-salsa armazenadas a 4°C, a vácuo, com diferentes doses de irradiação.

É possível verificar que as amostras controle armazenadas a 4°C apresentaram lesões escuras provocadas pelo frio, sendo mais intensas nas raízes armazenadas em saco plástico aberto (Figuras 7 e 9).

Se só levarmos em consideração a aparência das amostras, assim como foi feito por Scalón et al. (2002a e b), e como pode ser feita avaliando as imagens da Figura 9, poderíamos concluir que as amostras irradiadas têm uma boa aparência e coloração ao final de 30 dias, podendo ainda ser armazenadas por um período maior. Porém, no momento em que é feita uma leve pressão com os dedos ao longo de toda a área das raízes, é possível perceber que há áreas de textura diferente, caracterizando o início de lesões de apodrecimento mole, e, portanto inadequadas ao consumo.

Assim, foi determinado o tempo de conservação das amostras, que se encontra na Tabela 3. Os grupos que apresentaram um período mais longo, de 30 dias, foram as raízes irradiadas com 2kGy e 3kGy, embaladas a vácuo e conservadas a 4°C.

Tabela 3 - Tempo de viabilidade de amostras de mandioquinha-salsa, embaladas a vácuo ou não, armazenadas em temperatura ambiente (25°C) ou em câmara fria (4°C), com diferentes doses de irradiação gama.

	Saco plástico aberto		Embaladas a vácuo	
	25°C	4°C	25°C	4°C
Controle*	6 dias	10 dias	6 dias	17 dias
1kGy	6 dias	11 dias	8 dias	21 dias
2kGy	8 dias	30 dias	9 dias	30 dias
3kGy	8 dias	30 dias	8 dias	30 dias

* não irradiado

Os dados da Tabela 3 demonstram que nas doses de 2kGy e 3kGy houve um aumento no tempo de conservação das raízes. Esse aumento foi mais pronunciado quando associado à refrigeração.

5.3. Ensaio de conservação

A partir dos dados obtidos com o ensaio preliminar, foi elaborado um ensaio de conservação por um período de 30 dias com o objetivo de obter parâmetros químicos, físicos e biológicos para avaliar a qualidade das raízes ao final do período.

Os grupos armazenados em sacos plásticos abertos foram substituídos por caixas perfuradas com a finalidade de se obter condições semelhantes às observadas no comércio atacadista. Porém, as raízes armazenadas em caixas apresentaram um período mais curto de conservação devido ao aparecimento de lesão por frio que podem ser observadas na Figura 10.

Figura 10 – Raízes de mandioquinha-salsa armazenadas a 4°C, em caixas, apresentando níveis diferentes de lesão por frio, expostas a três doses de irradiação: (A) controle, (B) 1kGy, (C) 2kGy e (D) 3kGy após 4 dias de conservação.

O processo de escurecimento deve-se à ação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase presentes nas raízes de mandioquinha-salsa, sendo que a peroxidase

tem uma atuação inicial como resposta direta ao estresse causado pelo frio, e a polifenoloxidase com uma ação mais tardia (MENOLI, 2006).

Menoli (2006) avaliou o aparecimento de lesão por frio em raízes de mandioquinha-salsa armazenadas em duas temperaturas, 5°C e 10°C, por um período de 28 dias. Observou-se que houve um maior escurecimento nas raízes armazenadas a 5°C, assemelhando-se aos resultados obtidos no presente trabalho.

Segundo Ribeiro (2003), o escurecimento pode ser explicado pela mudança física dos lipídeos saturados das membranas celulares, causada pelas baixas temperaturas. As moléculas lipídicas passam do estado gel para o estado gel cristalino, permitindo oxidações enzimáticas, sendo essa mudança lipídica uma resposta primária dos tecidos sensíveis ao frio.

5.3.1. Textura

A textura firme das raízes *in natura*, além da aparência geral, é um dos parâmetros mais relevantes para o consumidor na hora da compra (RICO et al., 2007). A textura de um alimento pode ser muito importante para o consumidor, porém, este não associa a textura como um indicador da segurança do alimento, mas sim como um indicador da qualidade (LAWLESS; HEYMANN, 1999).

Foram avaliadas diariamente a energia de penetração (J) das raízes durante o período do ensaio de conservação. Os valores se encontram nas Tabelas 4 a 7. Também foram avaliados a influência da embalagem e da temperatura de armazenamento sobre a textura das raízes armazenadas (Figura 11 e 12).

Tabela 4 – Textura das amostras armazenadas a 25°C, em caixas.

Dia	Energia de penetração (J)			
	Controle	1kGy	2kGy	3kGy
1	188,09 (5,54) ^a _A	174,28 (5,83) ^a _A	175,54 (15,32) ^a _A	157,18 (4,87) ^{a,b} _B
2	199,05 (2,89) ^a _A	161,71 (6,83) ^a _B	145,85 (6,12) ^c _C	147,68 (5,67) ^b _C
3	176,28 (7,73) ^a _{A,B}	178,37 (15,59) ^a _A	156,22 (8,10) ^{b,c} _B	168,53(11,43) ^a _{A,B}
4	194,95 (8,99) ^a _A	183,76 (6,65) ^a _{A,B}	171,41(9,33) ^{a,b} _{B,C}	161,67(13,47) ^{a,b} _C
5	86,58 (71,01) ^b _A	142,03 (75,80) ^a _A	155,30 (3,31) ^{b,c} _A	144,83 (15,45) ^b _A
6		160,96 (12,55) ^a	179,02 (8,22) ^a	170,95 (7,21) ^a
7				161,14 (4,69) ^{a,b}
8				170,53 (6,16) ^a

Cada valor representa media (desvio padrão) de 5 determinações. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Para as análises ao longo do tempo, ou seja, dados de uma mesma coluna, as diferenças foram expressas em letras minúsculas. Enquanto que para análises entre grupos em um mesmo dia, ou seja, dados de uma mesma linha, as diferenças foram expressas com letras maiúsculas.

Tabela 5 – Textura das amostras armazenadas a 25°C, a vácuo.

Dia	Energia de Penetração (J)			
	Controle	1kGy	2kGy	3kGy
1	190,23 (4,18) ^a _B	198,99 (5,96) ^a _A	166,53 (2,36) ^{a,b} _C	169,23 (4,00) ^{a,b} _C
2	194,51 (15,45) ^a _A	166,46 (2,34) ^{a,b} _B	163,05 (4,39) ^{a,b} _B	151,79 (3,89) ^b _B
3	175,71 (30,26) ^a _A	168,83 (4,97) ^{a,b} _A	183,72 (13,87) ^a _A	164,40 (5,59) ^{a,b} _A
4	139,96 (18,00) ^b _B	167,17 (5,76) ^{a,b} _A	177,42 (3,19) ^a _A	168,63 (7,77) ^{a,b} _A
5	111,32 (15,68) ^b _C	141,54 (13,92) ^b _B	175,55 (9,05) ^a _A	158,09(16,04) ^{a,b} _{A,B}
6		161,40 (48,55) ^{a,b}	166,55 (14,30) ^{a,b}	177,14 (20,10) ^a
7		179,82 (8,46) ^{a,b}	29,46 (5,16) ^c	163,51 (6,48) ^{a,b}
8		186,16 (9,53) ^a	173,01 (14,81) ^a	155,68 (8,10) ^{a,b}
9			148,35 (16,06) ^b	

Cada valor representa media (desvio padrão) de 5 determinações. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Para as análises ao longo do tempo, ou seja, dados de uma mesma coluna, as diferenças foram expressas em letras minúsculas. Enquanto que para análises entre grupos em um mesmo dia, ou seja, dados de uma mesma linha, as diferenças foram expressas com letras maiúsculas.

Tabela 6 – Textura das amostras armazenadas a 4°C e m caixas.

Dia	Energia de Penetração (J)			
	Controle	1kGy	2kGy	3kGy
1	206,18(11,50) ^b _A	178,34(15,92) ^{a,b,c} _B	171,57(5,27) ^{b,c} _{B,C}	157,39(1,98) ^b _C
2	194,21(7,51) ^{b,c} _A	171,28(5,39) ^{a,b,c} _B	155,71(11,44) ^c _C	166,56(6,81) ^{a,b} _{B,C}
3	189,36(11,57) ^{b,c,d} _A	188,53(20,63) ^{a,b} _A	176,58(6,50) ^{a,b,c} _{A,B}	158,31(7,84) ^{a,b} _B
4	184,60(6,76) ^{b,c,d} _A	162,75(9,53) ^{b,c,d} _B	176,38(7,06) ^{a,b,c} _A	130,12(5,72) ^c _C
5	199,74(9,88) ^{b,c} _A	193,05(11,21) ^a _A	200,76(15,72) ^a _A	113,06(7,81) ^c _B
6	230,51(8,75) ^a _A	176,06(8,99) ^{a,b,c} _{B,C}	184,59(3,63) ^{a,b} _B	163,77(6,50) ^{a,b} _C
7	207,29(21,09) ^b _A	158,92(5,30) ^{c,d} _B	174,31(13,82) ^{b,c} _B	122,86(10,45) ^c _C
8	181,08(5,17) ^{c,d} _B	170,97(5,07) ^{a,b,c} _B	192,19(4,05) ^{a,b} _A	73,06(7,96) ^d _C
9	167,04(9,48) ^d _A	162,14(3,67) ^{c,d} _A	169,79(19,16) ^{b,c} _A	156,61(20,66) ^b _A
10	187,10(8,34) ^{b,c,d} _A	139,46(9,03) ^d _B	154,28(4,33) ^c _B	172,11(10,27) ^{a,b} _A
11		170,84(21,24) ^{a,b,c}	152,07(12,70) ^c	179,15(9,92) ^a
13			182,47(15,86) ^{a,b}	168,82(11,23) ^{a,b}
14			113,77(15,13) ^d	167,48(2,74) ^{a,b}

Cada valor representa média (desvio padrão) de 5 determinações. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Para as análises ao longo do tempo, ou seja, dados de uma mesma coluna, as diferenças foram expressas em letras minúsculas. Enquanto que para análises entre grupos em um mesmo dia, ou seja, dados de uma mesma linha, as diferenças foram expressas com letras maiúsculas.

Tabela 7 – Textura das amostras armazenadas a 4°C, a vácuo.

Dia	Energia de penetração (J)			
	Controle	1kGy	2kGy	3kGy
1	223,81 (7,29) ^{a,b} _A	175,13 (12,12) ^{c,d} _B	182,61(6,07) ^{a,b,c,d,e} _B	179,18(7,64) ^{a,b,c,d,e} _B
2	192,16 (15,76) ^{c,d} _A	159,45 (9,76) ^d _B	172,79 (9,38) ^{b,c,d,e} _B	159,54 (3,88) ^{e,f} _B
3	199,30 (7,51) ^{b,c,d} _A	190,79(11,56) ^{a,b,c} _{A,B}	184,64(4,81) ^{a,b,c,d} _B	169,19 (6,68) ^{b,c,d,e} _C
4	203,33(7,53) ^{a,d,c,d} _A	193,37 (5,80) ^{a,b,c} _{A,B}	194,06 (7,20) ^{a,b} _A	182,35(4,43) ^{a,b,c,d,e} _B
5	199,87 (4,06) ^{b,c,d} _A	184,30 (5,34) ^{b,c,d} _B	171,60 (9,00) ^{b,c,d,e} _C	176,75(7,89) ^{a,b,c,d,e} _{B,C}
6	217,91 (9,38) ^{a,b,c} _A	206,20 (13,61) ^{a,b} _{A,B}	188,11 (13,92) ^{a,b,c} _B	187,64 (4,94) ^{a,b,c,d} _B
7	225,82 (21,03) ^{a,b} _A	202,41 (12,64) ^{a,b} _{A,B}	181,70(3,26) ^{a,b,c,d,e} _B	198,89 (8,91) ^a _B
8	202,72(8,66) ^{a,b,c,d} _A	197,3 (12,17) ^{a,b,c} _A	204,17(19,43) ^a _A	176,69(18,25) ^{a,b,c,d,e} _A
9	200,65 (5,30) ^{b,c,d} _A	194,73(15,08) ^{a,b,c} _A	187,28 (8,29) ^{a,b,c} _A	163,95(12,94) ^{c,d,e} _B
10	190,12 (13,36) ^{c,d} _A	191,50(13,72) ^{a,b,c} _A	177,36(6,86) ^{a,b,c,d,e} _{A,B}	169,26(7,01) ^{b,c,d,e} _B
11	231,64(23,22) ^a _A	205,12 (14,48) ^{a,b} _{A,B}	179,95(7,46) ^{a,b,c,d,e} _B	181,34(9,41) ^{a,b,c,d,e} _B
13	184,69(13,80) ^d _A	184,22(10,80) ^{b,c,d} _A	164,56 (3,86) ^{c,d,e} _B	191,30 (11,59) ^{a,b} _A
14	214,78(13,10) ^{a,b,c,d} _A	193,57(10,11) ^{a,b,c} _B	205,04(10,04) ^a _{A,B}	189,54 (3,21) ^{a,b,c} _B
15	206,62(15,84) ^{a,b,c,d} _A	194,86(11,90) ^{a,b,c} _{A,B}	182,48(9,93) ^{a,b,c,d,e} _B	183,99(7,92) ^{a,b,c,d,e} _B
16	207,54 (7,74) ^{a,b,c,d} _A	197,51 (6,37) ^{a,b,c} _A	181,67(5,68) ^{a,b,c,d,e} _B	167,71 (8,95) ^{b,c,d,e} _C
17	223,03 (14,42) ^{a,b} _A	213,54 (7,80) ^a _A	193,69 (6,62) ^{a,b} _B	181,41(10,09) ^{a,b,c,d,e} _B
18		196,88 (8,47) ^{a,b,c}	182,39(10,42) ^{a,b,c,d,e}	172,29 (5,71) ^{b,c,d,e}
19		184,29 (6,52) ^{b,c,d}	177,66(13,70) ^{a,b,c,d,e}	162,22(19,34) ^{d,e}
20		212,02 (16,15) ^a	158,39 (8,85) ^{d,e}	169,34 (20,42) ^{b,c,d,e}
21			156,07 (14,64) ^e	176,39 (5,92) ^{a,b,c,d,e}
22			171,56 (16,52) ^{b,c,d,e}	180,66(11,00) ^{a,b,c,d,e}
23			169,38 (28,83) ^{b,c,d,e}	186,69 (8,76) ^{a,b,c,d}
24			187,81 (11,46) ^{a,b,c}	182,19 (8,62) ^{a,b,c,d,e}
25			174,09 (12,12) ^{b,c,d,e}	190,06 (6,65) ^{a,b,c}
26			113,42(10,50) ^f	188,50 (11,65) ^{a,b,c,d}
27				135,73 (18,22) ^f
28				83,26 (17,57) ^g

Cada valor representa media (desvio padrão) de 5 determinações. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Para as análises ao longo do tempo, ou seja, dados de uma mesma coluna, as diferenças foram expressas em letras minúsculas. Enquanto que para análises entre grupos em um mesmo dia, ou seja, dados de uma mesma linha, as diferenças foram expressas com letras maiúsculas.

Figura 11 – Influência do tipo de embalagem na textura das raízes não irradiadas armazenadas a 25°C(A) e 4°C (B).

Figura 12 – Influência da temperatura de armazenamento na textura de raízes não irradiadas armazenadas em caixas (A) e vácuo (B).

É possível observar que a energia de penetração foi proporcionalmente menor quanto maior foram as doses de irradiação. O parâmetro irradiação interferiu na textura significativamente em todos os grupos. Nas amostras armazenadas a 4°C, tanto em caixas quanto a vácuo, a irradiação, em todas as doses, reduziu a textura significativamente em relação às amostras controle (sem irradiação) já no primeiro dia de ensaio, podendo assim concluir que a textura das raízes foi afetada inicialmente pela irradiação e posteriormente pela ação de enzimas pectinolíticas ($p<0,05$).

O último dia de análise - quinto dia - de ambas as amostras a 25°C (vácuo e caixa) foi significativamente menor do que todos os dias dos grupos irradiados ($p<0,05$), provavelmente por uma ação mais intensa das bactérias pectinolíticas, que desde o início nos grupos controle estavam em maior número.

Nayak et al. (2006) avaliaram os efeitos da irradiação gama em cenoura, batata e beterraba em doses de 3,0 a 12,0kGy. Foi observada uma quebra progressiva da estrutura da parede celular com o aumento da dose, resultando em um amolecimento do tecido das três raízes. O estudo conclui que houve um aumento da permeabilização da parede celular, perda de pressão de turgor e/ou hidrólise de componentes estruturais da parede celular, levando a um amolecimento do tecido e perda de propriedades de textura e histológicas.

Hajare et al. (2006) irradiaram cenouras e pepinos com dose de 2kGy. A textura foi avaliada nas regiões periféricas e centrais dos dois vegetais. Em relação à cenoura, não houve mudança significativa da textura na região central após a irradiação e durante o período de armazenamento de 16 dias, enquanto que na região periférica houve uma redução significativa da firmeza. Entretanto, isso não teve efeito significativo na aceitabilidade após realização de uma análise sensorial.

A mudança de textura em vegetais está associada com atividades enzimáticas e não-enzimáticas, e entre elas a principal é a degradação enzimática da pectina da parede celular vegetal. Na degradação da pectina, o ataque enzimático é aparentemente coordenado, ocorrendo primeiramente uma desmetilação parcial pela ação da pectinesterase resultando em metanol e uma pectina de baixo grau de metilação, seguida por uma despolimerização, causada pela poligalacturonase,

gerando ácido poligalacturônico, o que resulta em perda de firmeza do tecido (RICO et al., 2007; VU et al., 2003).

Em cenouras, a existência de PG endógena é praticamente nula (RICO et al., 2007). Levando em consideração a similaridade das duas raízes tuberosas, podemos assumir que o mesmo ocorre em raízes de mandioquinha-salsa, porém não há estudos que comprovem a real ausência de enzimas endógenas em raízes de mandioquinha-salsa.

Somente em raízes armazenadas a 4°C houve influencia da embalagem sobre a textura das raízes, sendo que as amostras armazenadas a vácuo tiveram uma maior firmeza significativa em relação às armazenadas em caixas ($p < 0,05$). Nas amostras armazenadas a 25°C essa influencia não foi observada, havendo somente diferença ao longo do tempo ($p < 0,05$).

Com relação à influência da temperatura, houve diferença estatística em ambas as embalagens, tanto no parâmetro temperatura quanto no parâmetro tempo ($p < 0,05$). Na figura 12, é possível observar que a 4°C a textura se mantém estável por mais tempo, enquanto que a 25°C os valores vão diminuindo ao longo do tempo. Isso ocorre provavelmente por que as atividades das enzimas pectinolíticas são maiores a 25°C do que a 4°C ao final de seis dias de conservação.

Não foram encontrados estudos na literatura para comparação com os dados de influência da embalagem e temperatura sobre a textura de raízes.

Ao longo do tempo todas as amostras foram perdendo textura, se tornando menos firmes, além do aumento do desvio padrão, e por conseqüência aumento do coeficiente de variação. O aumento do desvio padrão deve-se, sobretudo, à existência de pontos de apodrecimento-mole nas extremidades da raiz, causando a destruição das cadeias de pectina em pontos localizados. Somente em estagio muito avançado do apodrecimento das raízes é que estas se apresentavam amolecidas em toda a extensão.

Foi observado que em algumas análises de raízes em que a deterioração se encontrava avançada, tanto em pontos isolados quanto na raiz inteira, que o texturômetro não mais iniciava a medida de textura no momento em que o *probe* agulha penetrava na raiz, mas sim no momento em que atingia uma área mais interna

que ainda não havia sido afetada, levando a uma falsa medida de firmeza. Para estudos posteriores, sugerem-se duas alternativas: o uso concomitante de outro *probe* com um formato cilíndrico juntamente com o de formato agulha; assim, mesmo que inicialmente não haja leitura com o *probe* cilíndrico pela dureza da raiz ser excessiva, ao longo do estudo de conservação a perda de firmeza possibilitará a leitura paralela e a continua avaliação da firmeza. Outra possibilidade é a não utilização da raiz inteira, mas sim de rodela de aproximadamente 1cm de espessura, e a utilização do *probe* cilíndrico para as medidas de firmeza; porém este método tem a desvantagem de não avaliar a raiz como um todo, mas sim mensurar a rigidez de tecidos diferentes, o que pode dificultar as análises e futuras discussões.

Ocorreram diferenças pontuais entre dias de um mesmo grupo e entre dias grupos diferentes que não foram citados nem nas tabelas nem no texto, devido à impossibilidade de apresentação de uma maneira clara e concisa.

5.3.3 Análises microbiológicas

5.3.3.1. Contagem total de microrganismos mesófilos

O ensaio de contagem total do número de bactérias presentes nas amostras ao longo do tempo teve como objetivo avaliar a eficiência da irradiação. Os dados encontram-se nas Tabelas 8 e 9.

Devido ao espaço limitado para incubação das placas, e ao número excessivo de diluições realizadas, foram semeadas somente a última diluição de cada amostra. As diluições foram estimadas inicialmente de acordo com testes preliminares, e a partir do segundo dia, de acordo com o crescimento observado nas placas do dia anterior. Valores nas tabelas precedidos do sinal “<” correspondem ao limite de quantificação da diluição menor àquela semeada devido à ausência de bactérias na placa após 48h de incubação. Valores precedidos do sinal “>” correspondem ao limite de quantificação de uma diluição maior àquela semeada devido ao crescimento excessivo de colônias, impossibilitando a contagem.

A partir do 14º dia foi observado um aumento da presença de colônias de fungos nas placas de AN. Como as amostras a partir desse período eram em sua maioria embaladas a vácuo, podemos admitir que fossem leveduras, já que bolores são aeróbios estritos (FRANCO; LANDGRAF, 1996). lemma (2001) relata que a contagem de leveduras e bolores de raízes de mandioquinha-salsa irradiadas permaneceu em níveis aceitáveis até o 14º dia.

Tabela 8 – Contagem total de microrganismos mesófilos presentes em raízes de mandioquinha-salsa submetidas a três doses de irradiação, embaladas em caixas ou a vácuo, mantidas a 25°C (UFC/g de amostra)

Dias	Caixas				Vácuo			
	Controle	1kGy	2kGy	3kGy	Controle	1kGy	2kGy	3kGy
1	3.10^7 (a)	2.10^5 (a)	$<10^5$ (b)	5.10^4 (b)	$2,4.10^7$ (c)	$1,14.10^7$ (c)	8.10^5 (c,d)	3.10^4 (d)
2	5.10^6	$1,1.10^6$	$6,1.10^4$	$<10^4$	$2,4.10^7$	5.10^6	$7,4.10^6$	$>3.10^4$
3	$2,0.10^7$	$1,57.10^6$	$>3.10^3$	$2,44.10^5$	$1,72.10^8$	$7,3.10^6$	$1,10.10^7$	$2,6.10^6$
4	$5,9.10^7$	$1,6.10^6$	$>3.10^4$	$1,39.10^5$	$1,62.10^9$	$2,28.10^7$	$6,5.10^7$	$1,81.10^7$
5	$2,1.10^8$	9.10^5	1.10^4	3.10^4	$4,5.10^8$	$3,4.10^8$	$>3.10^6$	$>3.10^6$
6	-	$9,2.10^6$	4.10^3	$8,5.10^4$	-	$2,3.10^8$	$1,6.10^6$	$4,9.10^5$
7	-	-	-	8.10^4	-	$2,3.10^8$	$6,5.10^6$	5.10^6
8	-	-	-	$4,3.10^5$	-	$2,5.10^8$	$2,55.10^7$	$>3.10^4$
9	-	-	-	-	-	-	$1,7.10^8$	-

Letras iguais significam que não houve diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 9 - Contagem total de microrganismos mesófilos presentes em raízes de mandioquinha-salsa submetidas a três doses de irradiação, embaladas em caixas ou a vácuo, mantidas a 4°C (UFC/g de amostra)

Dias	Caixas				Vácuo			
	Controle	1kGy	2kGy	3kGy	Controle	1kGy	2kGy	3kGy
1	$1,2 \cdot 10^7$ (a)	$9 \cdot 10^5$ (a,b)	$1 \cdot 10^5$ (b,c)	$3 \cdot 10^4$ (b,c)	$1,9 \cdot 10^7$ (d)	$1,5 \cdot 10^6$ (d,e)	$4 \cdot 10^5$ (e,f)	$6,5 \cdot 10^5$ (e,f)
2	$3,6 \cdot 10^7$	$>3 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^5$	$<10^4$	$1,03 \cdot 10^8$	$1,64 \cdot 10^7$	$1,88 \cdot 10^7$	$4,12 \cdot 10^6$
3	$1,7 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^5$	$2,36 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^7$	$7,8 \cdot 10^6$	$6,4 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$
4	$6 \cdot 10^6$	$4,9 \cdot 10^5$	$1,40 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^5$	$1,49 \cdot 10^8$	$1,46 \cdot 10^7$	$2,48 \cdot 10^7$	$7,3 \cdot 10^6$
5	$1,31 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^6$	$8,2 \cdot 10^5$	$1,17 \cdot 10^6$
6	$5,2 \cdot 10^7$	$8,0 \cdot 10^6$	$1,37 \cdot 10^5$	-	$2,4 \cdot 10^7$	$1,43 \cdot 10^7$	$>7,5 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^5$
7	$<10^7$	$<10^7$	$2,59 \cdot 10^5$	$4,08 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^5$	$4,7 \cdot 10^6$
8	-	$2,3 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	$8,2 \cdot 10^5$
9	$<10^7$	$2 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$	$4,3 \cdot 10^7$	$4,18 \cdot 10^6$
10	$1,3 \cdot 10^7$	$2,04 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^5$	$>3 \cdot 10^5$	$8,36 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^6$
11	-	$2,6 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^4$	$>3 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^6$	-
12	-	-	$2,48 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^6$	$3,9 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$
13	-	-	$3,8 \cdot 10^6$	$1,53 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^8$	$>3 \cdot 10^6$	$5,40 \cdot 10^9$	$2,6 \cdot 10^7$
14	-	-	$1,67 \cdot 10^7$	$1,02 \cdot 10^7$	$1,75 \cdot 10^8$	$1,04 \cdot 10^9$	$9 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^6$
15	-	-	-	-	$2,6 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	$4,3 \cdot 10^7$
16	-	-	-	-	$1,3 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	$6,3 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^7$
17	-	-	-	-	$1,6 \cdot 10^8$	$>3 \cdot 10^9$	$2,6 \cdot 10^8$	-
18	-	-	-	-	-	$3 \cdot 10^8$	$7 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^6$
19	-	-	-	-	-	$<10^9$	$2 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^7$
20	-	-	-	-	-	$3,2 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^8$
21	-	-	-	-	-	$>10^7$	$9 \cdot 10^6$	$9 \cdot 10^6$
22	-	-	-	-	-	-	$1,4 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^6$
23	-	-	-	-	-	-	$1,7 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$
24	-	-	-	-	-	-	$1,9 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^7$
25	-	-	-	-	-	-	$1,52 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^7$
26	-	-	-	-	-	-	$<10^8$	$4,5 \cdot 10^8$
27	-	-	-	-	-	-	-	$2,9 \cdot 10^8$
28	-	-	-	-	-	-	-	$7 \cdot 10^6$

Letras iguais significam que não houve diferença estatística ($p < 0,05$).

No primeiro dia, todas as amostras controle já se encontravam com um número elevado de microrganismos (10^7 UFC/g), número considerado crítico na literatura (SMADJA et al., 2004), o que pode explicar o baixo tempo de conservação das raízes.

A irradiação na dose de 1kGy não alterou significativamente a carga inicial de microrganismos em nenhum dos grupos com relação ao controle ($p < 0,05$). Já as doses de 2 e 3kGy diminuíram a população quando comparados aos respectivos grupos controle significativamente ($p < 0,05$). Ainda assim, o número residual de bactérias viáveis é excessivamente alto para uma hortaliça que tenha sofrido duas etapas de processamento: a higienização inicial para a remoção de resíduos de solo e a irradiação.

As amostras irradiadas com a dose de 3kGy e armazenadas a 25°C apresentaram uma população menor de bactérias ao longo de todo o ensaio.

Após a irradiação das amostras com as doses de 2 e 3kGy, pode-se observar um lento crescimento do número de bactérias, que é mais evidente nas amostras armazenadas a 4°C, o que caracteriza a diminuição do metabolismo bacteriano pelo resfriamento.

lemma (2001) avaliou a eficiência da irradiação gama em mandioquinha-salsa minimamente processada e embalada a vácuo observou que amostras irradiadas com 2 e 4kGy uma população abaixo da do controle durante todo o ensaio de conservação (28 dias), observando somente um maior crescimento a partir do 14º dia, concluindo que a irradiação gama se mostrou eficiente no controle da população microbiológica, sendo uma alternativa interessante para a conservação pós-colheita.

Neste estudo, a irradiação diminuiu a população microbiana, sendo que as amostras irradiadas com 3kGy, em ambas as temperaturas e embalagens, foram as que demoram mais tempo para atingir populações semelhantes ao controle, enquanto que as demais amostras levaram poucos dias.

Ghanekar et al. (1983) avaliaram o efeito da irradiação em batatas e a uma possível alteração da susceptibilidade ao apodrecimento mole, e relataram que doses maiores que 10krad (equivalente a 0,1kGy) causaram maior susceptibilidade concomitante às doses empregadas, por formarem peridermes fisicamente mais frágeis, e contendo níveis mais baixos de fenólicos e fitoalexinas – substâncias associadas a resistência à fitopatologia – em comparação a batatas não irradiadas.

Quando comparado o efeito da embalagem sobre a população microbiana foi observado uma diferença significativa entre as duas embalagens (caixa e vácuo)

quando a amostra foi armazenada a 4°C, havendo uma população microbiana menor em caixas, mas a mesma diferença não foi observada a 25°C. Quando comparada a influencia da temperatura, mantendo-se invariável a embalagem, não foi observada nenhuma diferença estatística ($p < 0,05$). A diferença observada a 4°C pode ser devido aos efeitos de lesão pelo frio e pela perda mais acentuada de massa fresca, conforme relatado na literatura (AVELAR-FILHO, 1989).

5.3.3.2. Isolamento de Bactérias Pectinolíticas

As colônias obtidas em placas de ágar nutriente (AN) foram transferidas para frutos de pimentão verde, com o auxílio de palitos estéreis. Devido à limitação de quantidade de pimentões que podiam ser inoculados e incubados diariamente, foi estabelecido um número máximo de 50 colônias por grupo. Foram isolados a partir do fruto de pimentão 69 colônias de bactérias pectinolíticas distribuídas pelos grupos de diferentes tratamentos (Tabela 10). Só foram isoladas colônias pectinolíticas até o 14° dia de análise, do 15° dia até o final do ensaio todas as colônias inoculadas nos frutos de pimentão não produziram lesão de apodrecimento-mole. Coincidentemente a partir deste momento foi observado o aumento do crescimento de fungos nas amostras.

Sabe-se que as bactérias do gênero *Erwinia* competem com outros microrganismos pectinolíticos ou não pelo substrato, podendo liberar antibióticos com esse objetivo (TOTH et al., 2003). Assim, a ausência de isolados a partir do 14° dia pode comprovar um desequilíbrio da microbiota com o favorecimento do crescimento dos fungos.

Tabela 10 – Contagem do número de bactérias que causaram lesão de apodrecimento-mole em frutos de pimentão verde após 30 dias de armazenamento.

25°C				4°C			
Caixa		Vácuo		Caixa		Vácuo	
Controle	10	Controle	25	Controle	1	Controle	3
1kGy	1	1kGy	9	1kGy	3	1kGy	3
2kGy	0	2kGy	2	2kGy	2	2kGy	2
3kGy	0	3kGy	1	3kGy	3	3kGy	4

Os resultados da Tabela 10 evidenciam que o vácuo propicia a multiplicação de bactérias pectinolíticas por selecionar o crescimento de bactérias anaeróbias, sendo que entre estas se encontram as subespécies *Erwinia*. O vácuo limita o crescimento de *Pseudomonas* já que as bactérias desse gênero são aeróbias estritas (FRANCO; LANDGRAF, 1996), aumentando assim a probabilidade de identificação positiva para *Erwinia* entre as bactérias pectinolíticas isoladas. Também podemos observar um número maior de bactérias isoladas a partir de amostras armazenadas a 25°C, o que demonstra que a refrigeração pode ter limitado o crescimento das bactérias deteriorantes. Apesar da quantidade de isolados, não houve diferenças estatísticas na frequência dos isolados ($p < 0,05$).

5.3.3.3. Capacidade relativa de maceração (CRM) dos isolados

A avaliação da capacidade relativa de maceração visa avaliar a capacidade de produção de enzimas pectinolíticas extracelulares produzidas pela bactéria e, portanto, conseguir avaliar a sua agressividade.

Dos 69 isolados armazenados em água estéril, cinco não cresceram quando inoculados em meio BHI. Segundo Liao e Shollenberger (2003), as bactérias do gênero *Erwinia* tiveram uma sobrevivência de 100% após 14 anos armazenadas em água

estéril, o que não ocorre com outras bactérias fitopatogênicas. Assim, há a possibilidade que isolados que não sobreviveram não eram do gênero *Erwinia*.

Entre os isolados que apresentaram crescimento, foram escolhidos aleatoriamente sete para a elaboração de uma curva de crescimento (Figura 13). A partir dessa curva foi possível determinar aproximadamente a população que foi inoculada nos frutos de pimentão verde para a avaliação da CRM.

Figura 13 – Curva de crescimento microbiano de bactérias pectinolíticas isoladas em raízes de mandioquinha-salsa.

Dos 64 isolados inoculados em frutos de pimentão, somente 13 provocaram lesão após 48h de incubação, e destes 12 eram isolados de raízes de grupos controle, ou seja, que não sofreram irradiação. Este resultado sugere que a irradiação pode ter causado alguma mutação nos isolados bacterianos, sendo caracterizado pela ausência de atividade enzimática, não sendo um efeito imediato já que durante o ensaio de conservação os isolados foram selecionados justamente por sua capacidade de macerar o tecido do pimentão. Porém, nenhum estudo foi encontrado que pudesse corroborar ou contradizer esses resultados.

A partir da mensuração das lesões causadas pelos 13 isolados foi possível a classificação dos mesmos em três categorias: pequena, média e alta CRM (Tabela 11).

A maioria dos isolados teve uma pequena CRM (46,15%) ao contrario do que foi obtido por Henz (2001) que encontrou uma maioria de isolados de alta CRM (72,2%). Bactérias com pequenas CRM podem ocasionar baixas taxas de infecção (HENZ, 2001).

Tabela 11 – Capacidade relativa de maceração de bactérias pectinolíticas isoladas em raízes de mandioquinha-salsa.

CRM	Média (mm ²)	Mínimo (mm ²)	Máximo (mm ²)
Pequena (46,15%)	254,37	108,79	396,81
Média (30,77%)	668,36	527,54	798,22
Alta (23,08%)	998,58	840,14	1216,48

5.3.3 Atividade das enzimas pectinolíticas

Pagel e Reitefuss (1990) determinaram uma seqüência de atividade das enzimas pectinolíticas liberadas pela *Erwinia* em batata. Nesse estudo foi observado que havia antes da inoculação uma atividade de PME, que foi atribuída a presença de uma enzima endógena. Após 10 horas de inoculação foi observado um aumento da atividade de PG, seguida por PeL após 14 horas. O trabalho ainda observou que alguns fatores podem influenciar essas atividades, como, por exemplo, o grau de esterificação da pectina – quanto mais alto, menor se tornam as atividades de PG e PeL. Além disso, sabe-se que algumas mudanças podem resultar da liberação de inibidores ou ativadores com a destruição da compartimentalização celular. No caso da batata e do kiwi foi possível isolar substancias inibidoras da atividade de PME (McMILLAN; PÉROMBELON, 1995).

A análise da atividade de enzimas pectinolíticas ao longo do estudo de conservação teve como objetivo associar o perfil enzimático e suas alterações após os

diversos tratamentos com os dados de textura e contagem microbiológica, procurando assim entender de uma maneira mais abrangente os resultados obtidos.

5.3.3.1. Pectato liase (PeL)

A atividade de PeL ao longo do período de conservação se encontra nas Figuras 14, 15, 16 e 17.

O parâmetro irradiação não provocou diferenças estatísticas na atividade enzimática das amostras armazenadas a 4°C em caixas, havendo somente diferença ao longo do tempo, onde o 12° dia foi significativamente maior que os demais. Nos demais grupos, tanto a irradiação quanto o tempo diferiram no quesito influência na atividade enzimática de PeL. No grupo armazenado em caixas a 25°C, o 3° e 5° dias das amostras controle foram significativamente maiores em comparação com os outros dias da amostra controle e também maiores que todos os dias das amostras irradiadas; e o 7° dia do grupo irradiado com 3kGy também foi significativamente maior que os dias 1°, 4° e 5° do grupo controle, que todos os dias dos grupos irradiados com 1 e 2kGy, e que todos os dias das amostras irradiadas com 3kGy, exceto o 3° dia ($p < 0,05$).

Figura 14 – Atividade da enzima pectato liase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada em caixas a 25°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy.

Figura 15 – Atividade da enzima pectato liase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada a vácuo a 25°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy.

Figura 16 – Atividade da enzima pectato liase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada em caixas a 4°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy.

Figura 17 – Atividade da enzima pectato liase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada a vácuo a 4°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy.

No grupo conservado a 25°C, a vácuo, o 3° dia do grupo controle foi significativamente maior que todos os dias dos grupos controle e irradiados. O 3° e 8° dias do grupo irradiado com 2 kGy foi significativamente maior do que todos os dias dos grupos irradiados ($p < 0,05$).

A grande atividade de PeL observada nos grupos conservados a 25°C, em ambas as embalagens, confirma os dados observados na Tabela 10, sendo os grupos dos quais foram isolados uma maior quantidade de bactérias causadoras de apodrecimento-mole em frutos de pimentão.

Nas amostras armazenadas a 4°C a vácuo, o 1° dia do grupo controle foi significativamente maior que todos os dias do grupo controle e grupos irradiados; o 14° dia do grupo controle também foi significativamente maior que os demais dias do grupo

controle (exceto o primeiro dia), sendo igual ao dia 9º, foi maior que todo os dia do grupo irradiado com 1kGy, 2kGy (exceto o 14º) e 3kGy (exceto o 18º) ($p<0,05$).

A grande variação dos resultados pode ter ocorrido devido a vários fatores. Entre eles podemos citar: a utilização de um número reduzido de amostras para a obtenção do extrato enzimático; o volume de cada tomada de ensaio; a necessidade de utilização de raízes diferentes; o alcance homogêneo da irradiação gama; entre outros. Além das já citadas, outra hipótese para a dispersão de resultados é a presença de fungos que também liberem PeL que podem estar presentes na amostra, e estejam competindo com as bactérias pelo substrato. Entre todos, esta parece ser a hipótese mais provável, pois foi observado um número elevado de colônias de fungos nas placas de AN após o 14º dia.

A PeL presente em raízes de mandioquinha-salsa pode ser proveniente das erwinias pectinolíticas (*Ecc* e *Ech*), ou de outras bactérias pectinolíticas, além de uma série de fungos fitopatogênicos. Os fungos, que são conhecidamente mais resistentes a irradiação do que as bactérias (FRANCO; LANDGRAF, 1996) podem agir nas raízes como um fitopatógeno oportunista, principalmente no final do período de conservação, quando foi observado um aumento no crescimento de colônias de leveduras.

Outro fato que corrobora com essa hipótese é que se houverem condições específicas que favoreçam o crescimento de fungos, e entre estas podemos salientar o pH ácido e um substrato rico em carboidratos, estes se tornam predominantes. (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Ao longo do tempo de conservação, o pH das raízes foi medido para a extração das enzimas. E foi observado que o pH caiu ao longo do tempo para valores próximos a 4 (dados não apresentados), o que poderia favorecer o crescimento de fungos, e caracterizar um processo fermentativo.

Ocorreram diferenças pontuais entre dias de um mesmo grupo e entre dias grupos diferentes que não foram citados no texto, devido à impossibilidade de apresentação de uma maneira clara e concisa.

Para avaliar o efeito da embalagem e o efeito da temperatura sobre a atividade de PeL, foram analisados os dados das raízes sem irradiação, ou seja, os grupos controle (Figuras 18 e 19 respectivamente).

A atividade de PeL foi maior quando as amostras estavam armazenadas a 25°C tanto em caixas quanto a vácuo, porém não houve diferença entre as embalagens ($p < 0,05$). Entretanto, na conservação em 4°C houve uma diferença entre as embalagens no parâmetro influência da embalagem sobre a atividade de PeL, onde inicialmente (primeiro dia) há uma atividade maior nas raízes embaladas a vácuo tanto com relação aos demais dias do vácuo quanto a todos os dias das amostras armazenadas em caixas ($p < 0,05$).

Avaliando o efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi verificado que as atividades a 25°C são significativamente maiores que a 4°C ($p < 0,05$), fato que já era esperado já que em 25°C as bactérias do gênero *Erwinia* encontradas em solo brasileiro estão mais próximas a temperatura ótima de desenvolvimento.

Figura 18 – Efeito da embalagem sobre a atividade de PeL com amostras não irradiadas armazenadas a 25°C (A) e a 4°C (B).

Figura 19 – Influência da temperatura sobre a atividade de PeL com amostras não irradiadas armazenadas em caixas (A) e a vácuo (B).

Levando em consideração os dados das Figuras 18 e 19, podemos concluir que a temperatura é o fator que mais afeta diretamente a atividade de PeL, sem sabermos no entanto se a enzima é endógena ou microbiana.

5.3.3.2. Poligalacturonase (PG)

Os resultados da atividade da enzima PG estão nas Figuras 20 a 25.

Nas amostras armazenadas em caixas a 25°C houve uma tendência de diminuição da atividade ao longo do tempo (Figuras 20A, C e D), enquanto que a vácuo não houve tendência definida (Figuras 21). No armazenamento a 4°C, só houve tendência de aumento nos grupos, 4C1, 4V2 e 4V3 (Figuras 22B, 21C e D). Nos demais grupos, os resultados não apresentaram tendências.

Figura 20 - Atividade da enzima poligalacturonase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada em caixas a 25°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy.

Figura 21 - Atividade da enzima poligalacturonase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada a vácuo a 25°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy.

Figura 22 - Atividade da enzima poligalacturonase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada em caixas a 4°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy.

Figura 23 - Atividade da enzima poligalacturonase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada a vácuo a 4°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy.

O parâmetro irradiação não fez diferença na atividade enzimática na maioria dos grupos exceto nas raízes armazenadas a 4°C a vácuo ($p < 0,05$). Ao longo do tempo houve diferenças pontuais entre dias do mesmo grupo e grupos diferentes, mas não houve um consenso dos dados.

Comparando os grupos armazenados a 25°C em caixas, houve diferença entre o primeiro e sexto dias ($p < 0,05$), onde no primeiro dia a atividade foi maior.

Os dados de atividade de PG apresentam uma grande dispersão ao longo do tempo, assim como observado nos dados de PeL. Como os fungos que degradam a parede celular vegetal, produzindo PeL, também produzem PG, a provável explicação para essa dispersão também pode ser a presença de fungos.

D’Innocenzo e Lajolo (2001) irradiaram papaia na dose de 0,5kGy e avaliaram o efeito da irradiação gama sobre a atividade de enzimas pectinolíticas endógenas do fruto, e verificaram que a irradiação afetou os padrões de atividade de PG e PME, e como consequência afetando o amadurecimento dos frutos. Os autores propuseram que a irradiação pode ter afetado a síntese de proteínas, e que a real avaliação do perfil enzimático após a irradiação é de difícil interpretação, já que a atividade de uma enzima pode influenciar a ação seqüencial de outras enzimas.

Apesar de as raízes de mandioca aparentemente não terem a produção de PG endógena (RICO et al., 2007) como já discutido anteriormente, podemos fazer a mesma correlação com relação as enzimas bacterianas que podem ter tido a sua síntese comprometida pela irradiação das amostras alterando o perfil enzimático.

Ocorreram diferenças pontuais entre dias de um mesmo grupo e entre dias grupos diferentes que não foram citados no texto, devido à impossibilidade de apresentação de uma maneira clara e concisa.

Avaliando a influência da embalagem e temperatura sobre a atividade de PG, foram avaliados os dados dos grupos controle (Figuras 24 e 25). Na análise estatística dos dados, não foi encontrada diferença entre as embalagens sobre a atividade enzimática, e somente a vácuo foi encontrada diferença entre as temperaturas, onde a 25°C há maior atividade enzimática, assim como foi encontrado na análise da atividade de PeL.

A **B**

Figura 24 – Influência da embalagem na atividade de PG em amostras não irradiadas de mandioquinha-salsa armazenada a 25°C (A) e 4°C (B).

Figura 25 – Efeito da temperatura sobre a atividade de PG de raízes de mandioquinha-salsa não irradiadas armazenadas em caixas (A) e a vácuo (B).

5.3.3.3. Pectinesterase (PME)

Os resultados da atividade da enzima PME estão nas figuras 26 a 31.

Figura 26 - Atividade da enzima pectinesterase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada em caixas a 25°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy.

Figura 27 - Atividade da enzima pectinesterase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada a vácuo a 25°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy.

Figura 28 - Atividade da enzima pectinesterase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada em caixas a 4°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy.

Figura 29 - Atividade da enzima pectinesterase em raízes de mandioquinha-salsa armazenada a vácuo a 4°C, expostas a três doses de irradiação. Dispersão dos dados individuais de análise de: (A) amostra não-irradiada; (B) amostra irradiada com 1kGy; (C) amostra irradiada com 2kGy; (D) amostra irradiada com 3kGy.

A atividade de PME tem sido encontrada em todas as plantas superiores examinadas e também em muitas bactérias fitopatogênicas e fungos (McMILLAN; PÉROMBELON, 1995). Pagel e Heitefuss (1990) encontraram atividade da enzima em batatas não inoculadas com *Eca* em seu estudo do perfil enzimático durante o processo de apodrecimento-mole no tubérculo. Levando em consideração a similaridade dos dois vegetais podemos assumir que o mesmo ocorre em raízes de mandioquinha-salsa, porém para se ter certeza da produção endógena de PME mais estudos devem ser conduzidos com esta finalidade. Até hoje não se sabe se a PME é ativa em tanto tecidos saudáveis assim como em tecidos infectados.

Além disso, a enzima também é produzida pelas bactérias do gênero *Erwinia* durante a patogênese. Porém, a PME sozinha não pode ser considerada responsável pelo processo de maceração por ser uma despolimerase (PAGEL; HEITEFUSS 1990).

A PME catalisa a conversão de pectina (ácido poligalacturônico metilado) à ácido poligalacturônico pela desesterificação do grupo metil éster com a produção de metanol. Tem sido demonstrado estar envolvida no amadurecimento de frutos por facilitar a ação de poligalacturonases diminuindo o grau de metilação. Pectinas com baixo grau de metilação são substratos ideais para a PG, e sua degradação resulta na perda de coesão tecidual. A PME também está envolvida no crescimento celular, sendo responsável pela autólise parcial da parede celular que é então reconstruída por glicotransferases (McMILLAN; PÉROMBELON, 1995).

Nas amostras armazenadas em caixas a 4°C, houve diferença da influência da radiação sobre a atividade de PME entre os grupos controle e 2kGy; e nas armazenadas a 25°C entre os grupos controle e 3kGy ($p < 0,05$), não havendo diferença entre os dias.

Nas amostras conservadas a 25°C a vácuo não houve influência nem da irradiação nem do tempo ($p < 0,05$).

Nas raízes conservadas a 4°C a vácuo houve influência tanto da irradiação quando do tempo, onde o 1° dia do grupo controle teve atividade maior que todos os dias do grupo controle (exceto 3° e 6° dias), que todos os dias do grupo irradiado com 1kGy (exceto 11° dia), todos os dias do grupo irradiado com 2kGy (exceto 4°, 5° e 10° dias) e todos os dias do grupo irradiado com 3kGy (exceto 27° dia) ($p < 0,05$). O 4° e 5° dias do grupo irradiado com 2kGy foram maiores que todos os dias do grupo controle (exceto 1° e 3° dias), todos os dias do grupo irradiado com 1kGy, 2kGy e 3kGy (exceto 27° dia com relação ao 4° dia) ($p < 0,05$).

Ocorreram diferenças pontuais entre dias de um mesmo grupo e entre dias grupos diferentes que não foram citados no texto, devido à impossibilidade de apresentação de uma maneira clara e concisa.

A influência dos parâmetros temperatura e embalagem sobre a atividade de PME pode ser observado nas Figuras 30 e 31, onde são comparados os dados dos grupos controle (sem irradiação).

Não houve diferença estatística na influência das embalagens sobre a atividade enzimática ($p < 0,05$). Quanto a temperatura, só foi observado diferença nas amostras armazenadas a vácuo ($p < 0,05$), onde pode ser observado na Figura 29B que até o terceiro dia a atividade é maior em 25°, porém seguida de uma diminuição da de atividade. Segundo Pagel e Reitefuss (1990) que em seu estudo caracterizaram a seqüência de atividade das enzimas pectinolíticas em batata após a inoculação de bactérias do gênero *Erwinia*, observaram que no tempo 0h já havia a atividade de PME, o que foi atribuído a presença de uma enzima endógena. Essa possível presença de PME endógena em raízes de mandioquinha-salsa pode explicar a alta atividade inicial de PME, seguida de queda da atividade da mesma. Já em amostras armazenadas a 4°C, a mesma queda pode ser observada, porém seguida de um novo aumento que pode ser atribuído a liberação da enzima exógena bacteriana ou fungica.

Figura 30 – Influência da embalagem na atividade de PME em amostras não irradiadas de mandioquinha-salsa armazenada a 25°C (A) e 4°C (B).

Figura 31 – Efeito da temperatura sobre a atividade de PME de raízes não irradiadas de mandioquinha-salsa armazenadas em caixas (A) e a vácuo (B).

6. Conclusões

- A combinação de processos de conservação (Irradiação, embalagem e temperatura) alterou o tempo de conservação das raízes de mandioquinha-salsa, prolongando o período de conservação de 5 dias para 28 dias.
- Os grupos que apresentaram os melhores resultados com relação a conservação foram os irradiados nas doses de 2 e 3kGy, embalados a vácuo e armazenados a 4°C.
- A irradiação nas doses de 2 e 3kGy diminuiu a textura das raízes, ou seja, quanto maiores as doses de irradiação menores os valores de energia de penetração, o que significa uma diminuição da rigidez do tecido ($p<0,05$).
- A irradiação diminuiu significativamente a população microbiana mesófila inicial das raízes nas doses de 2 e 3kGy, porém em poucos dias a quantidade de bactérias já se encontrava novamente com valores elevados ($p<0,05$).
- Foram isoladas 69 bactérias consideradas pectinolíticas, 5 mostraram-se inviáveis e os 64 isolados restantes somente 13 provocaram novamente lesão de apodrecimento-mole nos frutos de pimentão, sendo que destas 12 colônias foram isoladas a partir de amostras de grupos controle sem irradiação.
- A irradiação pode ter levado a uma mutação das cepas, o que é evidenciado pela falta de atividade das enzimas.
- A maior parte dos isolados de bactérias pectinolíticas eram de pequena capacidade de maceração (46,15%).
- Os tratamentos afetaram o perfil de atividade das enzimas pectinolíticas, porém a grande dispersão dos resultados e o pequeno número de raízes analisadas por dia, além da complexidade dos fatores que afetam a atividade das enzimas e as múltiplas origens possíveis – endógenas, bacterianas ou fungicas – sugerem que serão necessários mais estudos para elucidar essas alterações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*¹

ADA – AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Position of the American Dietetic Association: Food Irradiation. **Journal of the American Association**, v.100, n.2, p.246-253, 2000.

AGROFIT. Agrofit on line. Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons Último acesso em: 26 jan 2008.

ANDREWS, L.S.; AHMEDNA, M.; GRODNER, R.M.; LIUZZO, J.A.; MURANO, P.S.; MURANO, E.A.; RAO, R.M.; SHANE, S.; WILSON, P.W. Food preservation using ionizing radiation. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. v.154, p.1-53, 1998.

ANVISA – **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC nº21, de 26 de janeiro de 2001.

ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 13 ed., V.II Washington: AOAC, 1985.

AVELAR FILHO, J.A. Estudo de conservação pós-colheita da mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.). 1989. 62 f. (Tese mestrado) – UFV, Viçosa.

¹ * As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

BARRAS, F.; van GIJSEGEN, F.; CHATTERJEE, A.K. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot erwinia. **Annual Review of Phytopathology** v.32, p.201-234, 1994.

BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry** 3rd Rev. Ed. Germany: Springer, 2004

BENNINK, M.R. – Fiber analysis. In: NILSEN, S.S. – **Introduction of the Chemical Analysis of Food**. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1994, p.169-180.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CÂMARA, F.L.A.; SANTOS, F.F. **Cultura de Mandioquinha Salsa**. Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. V. 2 Fundação CARGILL, 2002, p.518-532. Disponível em: <http://www.abam.com.br/livroscargil/volume2.htm> Último acesso em: 18 ago 2008.

CATI – **Coordenadoria de Assistência Técnica Integral**. 1999. Disponível em: http://www.cati.sp.gov.br/novacati/tecnologias/catiresponde/cr37mandioquinha_salsa.html Último acesso em: 26 mai 2008.

CASTRO, I.A.; TIRAPEGUI, J.; SILVA, R.S.S.F.; CUTRIM, A.J.S. Sensory evaluation of a milk formulation supplemented with n3 polyunsaturated fatty acids and soluble fibres. **Food Chemistry**, v.85, n.4, p.503-512, 2004.

CNPH-EMBRAPA – **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária** – Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças. 2003. Disponível em: http://www.cnph.embrapa.br/paginas/produtos/cultivares/amarela_de_senador_a_maral.htm Último acesso em: 26 mai 2008.

COLLMER, A.; KEEN, N.T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. **Annual Reviews of Phytopathology**. v.24, p.383-409, 1986.

COTHER, E.J.; BLAKENEY, A.B.; LAMB, S.J. Laboratory-scale preparation of sodium polypectate for use in selective media for pectolytic *Erwinia* spp. **Plant Disease** v.64, n. 12, p.1086-1087, 1980.

CUPPELS, D.; KELMAN, A. Evaluation of a selstive media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue. **Phytopathology**, v.64, p. 468-475, 1974

DARRASSE, A.; PRIOUS, S.; KOTOUJANSKY, A.; BERTHEAUS, Y. PCR and restriction fragment of a pel gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. **Applied and Environmental Microbiology** v.60, n.5, p.1437-1443, 1994.

De BOER, S.H. Characterization of pectolytic erwinias as highly sophisticated pathogens of plants. **European Journal of Plant Pathology**, v.109, p.893-899, 2003.

De BOER, S.H.; KELMAN, A. Gram- negative bacteria. *Erwinia* Soft Rot Group. Em: SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. (eds) **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. 3rd edition. St. Paul: APS Press, 2001

D'INNOCENZO, M.; LAJOLO, F.M. Effect of gamma irradiation on softening changes and enzyme activities during ripening of papaya fruit. **Journal of Food Biochemistry** v.25, p.425-438, 2001.

Di PIETRO, A.; RONCERO, M.I.G. Purification and characterization of pectate lyase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* produced on tomato vascular tissue. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.49, p.177-185, 1996.

DUTCOSKY, S.D. **Análise Sensorial de Alimentos**. 123p. Ed. Universitária Champagnat. 1996.

EI TASSA, S.O.M., DUARTE, V. Ocorrência de pectobactérias em tubérculos de batata- semente no estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**.v.29, n.6, p.620-625, 2004.

FESSEHAIE, A.; De BOER, S.H.; LÉVESQUE, C.A. Molecular characterization of DNA encoding 16S-23S rRNA intergenic spacer regions and 26S rRNA of pectolytic *Erwinia* species. **Canadian Journal of Microbiology** v.48, n.5, p.387-398, 2002.

FILISSETTE-COZZI, T.M.C.C.; LAJOLO, F.M. Fibra alimentar insolúvel em alimentos brasileiros. **Revista de Farmácia-Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.27, n.1, p.83-99, 1991.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos** São Paulo: Ed. Atheneu, 1996.

- GHANEKAR, A.S.; PADWAL-DESAI, S.R.; NADKARNI, G.B. Irradiation of potatoes: influence on wound periderm formation and on resistance on soft roth. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.31, p.1009-1013, 1983.
- GOULD, G.W. Methods for preservation and extension of shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, v.33, n.1, p.51-64, 1996.
- GROSS, K.C. A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. **HortScience**, v.17, n.6, p.933-934, 1982.
- HAJARE, S.N.; DHOKANE, V.S.; SHASHIDHAR, R.; SHARMA, A.; BANDEKAR, J.R. Radiation processing of minimally processed carrot (*Daucus carota*) and cucumber (*Cucumis sativus*) to ensure safety: effect on nutritional and sensory quality. **Journal of Food Science** v. 71, n.3; p. 198-203, 2006.
- HANKIN, L.; ZUCKER, M.; SANDS, D.C. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Applied Microbiology**, v.22; n.2; p.205-209, 1971.
- HASEGAWA, H.; CHATTERJEE, A.; CUI, Y.; CHATTERJEE, A.K. Elevated temperature enhances virulence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain EC153 to plants and stimulates production of the quorum sensing signal, N-Acyl Homoserine lactone, and extracellular proteins. **Applied and Environmental Microbiology** v.71, n.8, p.4655-4663, 2005.
- HAUBEN, L.; MOORE, E.R.B.; VAUTERIN, M.; STEENACKERS, J.; MERGAERT, L.; VERDONCK, SWINGS, J. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. **Systematic and Applied Microbiology**. v.21. p. 384-397, 1998.

HENZ, G.P. Doenças da mandioquinha-salsa e a sua situação atual no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n.2, 135-144, 2002.

HENZ, G.P. Perdas pós-colheita e métodos de manejo da “podridão-mole” causada por *Erwinia chrysanthemi* Burkholder *et al.* e *Erwinia carotovora* spp. (Jones) Bergey *et al.* em raízes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Tese de doutorado. 2001. Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Brasília, Brasil.

HENZ, G.P.; LOPES, C.A.; SANTOS, F.F. Doenças pós-colheita de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). **Horticultura Brasileira**, v.10, n.2, p.58, 1992.

HENZ, G.P.; REIFCHNEIDER, F.J.B. Formas de apresentação e embalagens de mandioquinha-salsa no varejo brasileiro. **Horticultura Brasileira**, v.23, p.61-67, 2005.

HENZ, G.P.; REIFCHNEIDER, F.J.B.; DUARTE, V. *Erwinia chrysanthemi*: pectolytic bacterium causing soft rot outbreaks of arracacha in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.10, p. 1567-1571, 2006.

HENZ, G.P.; SOUZA, R.M.; PEIXOTO, J.R.; BLUMER, L. Danos causados pelo impacto de queda na qualidade pós-colheita de raízes de mandioquinha-salsa. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.4, p.881-886, 2005.

HERMANN, M. Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.) In: HERMANN, M.; HELLER, J. (ed) **Andean roots and tubers: ahipa, arracacha, maca and yacón**. Roma: IPGRI, 1997. p. 75-172.

HONDA, S.; NISHIMURA, Y.; TAKAHASHI, M.; CHIBA, H.; KAKEHI, K. A manual method for the spectrophotometric determination of reducing carbohydrates with 2-cyanoacetamide. **Analytical Biochemistry**. V.119, n.1, p.194-199, 1982.

HYMAN, L.J.; SULLIVAN, L.; TOTH, I.K.; PÉROMBELON, M.C.M. Modified crystal violet pectate medium (CVP) based on a new polypectate source (Slendid®) for the detection and isolation of soft rot erwinias. **Potato Research**. v.44, n.3, p.265-270, 2001.

ICGFI - Facts about food irradiation: a series of fact sheets from the International Consultative Group on Food Irradiation. ICGFI, Vienna.1999.

IEMMA, J. Efeito Da radiação gama na conservação da mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) minimamente processada e embalada à vácuo. Dissertação de mestrado. 2001. CENA – Centro de Energia Nuclear da Agricultura – Universidade de São Paulo, Brasil.

JABUONSKI, R.E.; TAKATSU, A.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Levantamento e identificação de espécies de *Erwinia* de diferentes plantas hospedeiras e regiões do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p. 185-195, 1986.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. 6th Ed. Maryland: Aspen Publishers, 2000.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-976, 1970.

KEER, A. A method of isolating soft-rotting bacteria from soils. **Nature** v.172, n.4390, p.1155, 1953.

KILDCAST, D. Irradiation and combination treatments. **Food Control**, v.2, n.1, p.6-8, 1991.

KLAVONS, J.A.; BENNETT, R.D. Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, V.34, p.597-599, 1988.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food – Principles and practices**. Maryland: Aspens Publishers, 1999.

LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.1, p.65-69, 2002.

LIAO, C.-H.; SHOLLENBERGER, L.M. Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. **Letters in Applied Microbiology** v.37, n.1, p.45-50, 2003.

LIPP, M.; SHILLITO, R.; GIROUX, R.; SPIELGELHALTER, F.; CHARLTON, S.; PINERO, D.; SONG, P. Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. **Journal of AOAC International**, v.88, n.1, p.136-155, 2005.

LOPES, C.A.; HENZ, G.P. Podridões-mole das hortaliças causada por bactérias. Brasília: Embrapa-CNPq, 1998. 6p. (Embrapa-CNPq. Comunicado Técnico da Embrapa Hortaliças, 8).

- McMILLAN, G.P.; PÉROMBELON, M.C.M. Purification and characterization of a high pl pectin methyl esterase isoenzyme and its inhibitor from tubers of *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Katahdin. **Physiological and Molecular Plant Pathology** v.46, p.413-427, 1995.
- MENOLI, L.N. Atuação das enzimas oxidativas em raízes de batata-baroa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.) submetidas a injúria por frio. Dissertação de mestrado em Fisiologia, 2006. Universidade Federal de Viçosa, Brasil.
- NASSAR, A.; DARRASSE, A.; LEMATTRE, M.; KOTOUJANSKY, A.; DERVIN, C.; VEDEL, R.; BERTHEAU, Y. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *Pel* genes. **Applied and Environmental Microbiology** v.62, n.7, p.2228-2235, 1996.
- NAYAK, C.A.; SUGUNA,K.; NARASIMHAMURTHY,K.; RASTOGI, N.K. Effect of gamma irradiation on histological and textural properties of carrots, potato and beetroot. **Journal of Food Engineering** v.79, p.765-770, 2007.
- PAGEL, W.; REITEFUSS, R. Enzyme activities in soft rot pathogenesis of potato tubers: effects of calcium, pH, and degree of pectin esterification on the activities of polygalacturonase and pectate lyase. **Physiological and Molecular Plant Pathology** v.37, p. 9-25, 1990.
- PALVA, T.K.; HOLMSTROM, K.; HEINO, P.; PALVA, E.T. Induction of plant defense response by exoenzymes of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** v.6, n.2, p.190-196, 1993.

PÉREZ, E.E.; BORNEO, R.; MELITO, C.G.; TOVAR, J. Chemical, physical and morphometric properties of peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* B.) starch. **Acta Científica Venezolana**, v.50, p.240-244, 1999.

PÉROMBELON, M.C.M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. **Plant Pathology** v.51, n.1, p.1-12, 2002.

PÉROMBELON, M.C.M.; KELMAN, A. Ecology of soft rot erwinias. **Annual Reviews in Phytopathology** v.18 p. 361-87, 1980.

PIRES, T.C.R. Alterações pós-colheita em raízes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.): atividade enzimática, identificação de contaminante e caracterização parcial do amido. Tese de doutorado. 2005. Departamentos de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, Brasil.

PIRES, T.C.R.; FINARDI-FILHO, F. Extraction and assay of pectic enzymes from Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) **Food Chemistry**, v.89, n.1, p.85-92, 2004.

PROSKY, L.; ASP, N.G.; FURDA, I.; DEVRIES, J.W.; SCHWEIZER, T.S.; HARLAND, B.F. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods, and food products: interlaboratory study. **Journal of AOAC International**, v.71, p.1017-1023, 1988.

PROSKY, L.; ASP, N.G.; SCHWEIZER, T.F.; DEVRIES, J.W.; FURDA, I. Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods and products: collaborative study. **Journal of the AOAC International**, v.75, n.2, p.360-367, 1992.

- RIBEIRO, R.A. Conservação pós-colheita e metabolismo de carboidratos em raízes de dois clones de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.). Tese de doutorado em Fitotecnia, 2005. Universidade Federal de Viçosa, Brasil.
- RIBEIRO, R.A.; FINGER, F.L.; PUIATTI, M.; CASALI, V.W.D. Chilling injury sensitivity in arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) roots. **Tropical Science** v.45, p.55-57, 2005.
- RIBEIRO, R.A.; FINGER, F.L.; PUIATTI, M.; CASALI, V.W.D. Vida útil e metabolismo de carboidratos em raízes de mandioquinha-salsa sob refrigeração e filme de PVC. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.4, p.453-458, 2007.
- RICO, D.; MARTÍN-DIANA, A.B.; BARAT, J.M.; BARRY-RYAN, C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. **Trends in Food Science & Technology** v.18, p. 373-386, 2007.
- RIDLEY, B.L.; O'NEILL, M.A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide related signaling. **Phytochemistry** v.57, n.6, p.929-967, 2001.
- ROMEIRO, R.S.; SOUSA, R.M.; MUCHOVEJ, J.J.; KIMURA, O. Soft rot of Peruvian carrot due to *Erwinia carotovora* in Brazil. **Plant Pathology**, v.37, n.2, p.300-302, 1988.
- SCALON, S.P.Q.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H. Combinações de cálcio, atmosfera modificada e refrigeração na conservação pós-colheita da mandioquinha-salsa. **Acta Scientiarum** v.24, n.5, p.1461-1466, 2002 a.

SCALON, S.P.Q., ZÁRATE, N.A.H.; VIEIRA, M.C Embalagem e temperature na manutenção da qualidade pós-colheita de mandioquinha-salsa. **Ciência e Agrotecnologia** V.26, n3, p.559-563, 2002b.

SCHOLS, H.A.; VORAGEN, A.G.J. Pectic polysaccharides In: WHITAKER, J.R.; VORAGEN A.G.J.; WONG, D.W.S. (eds) **Handbook of Food Enzymology**. New York: Marcel Dekker Inc., 2003. p.829-843.

SMADJA, B.; LATOUR, X.; TRIGUI, S.; BURINI, J.F.; CHEVALIER, S.; ORANGE, N. Thermodependence of growth and enzymatic activities in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (*Pectobacterium* spp.). **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.19-27, 2004.

SMID, E.J.; JANSEN, A.H.J.; GORRIS, L.G.M. Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia chrysanthemi* in potato tubers using polymerase chain reaction. **Plant Pathology**, v.44, n.6, p.1058-1069, 1995.

STATISTICA 8.0 for Windows, v. 1. Tulsa, OK: StatSoft Inc. Software, 2007.

STONE, H.; SIDEL, J.L. Sensory evaluation practices. 2nd Ed. San Diego: Academic, 1993 In: LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food – Principles and practices**. Maryland: Aspen Publishers, 1999.

TAKATSU, A. Erwinias do grupo carotovora no Brasil. **Fitopatologia Brasileira** v.8, p. 535-536, 1983.

- TAKATSU, A.; MELLO, S.C.M.; GARCIA, E.S.O. Fruto do pimentão como meio parcialmente seletivo para isolamento de *Erwinia carotovora*. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p.550-551, 1981.
- THAKUR, B.R.; SINGH, R.K. Combination processes in food irradiation. **Trends in Food Science & Technology**. V.6, p.7-10, 1995.
- THOMPSON, A.K. Reduction of losses during the marketing of arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). **Acta Horticulturae**, v.116, p.60-65, 1980.
- TOTH, I.K.; BELL, K.S.; HOLEVA, M.C.; BIRCH, P.R.J. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. **Molecular Plant Pathology** v.4, n.1, p.17-30, 2003.
- TOTH, I.K.; BIRCH, P.R.J Rotting softly and stealthily. **Current Opinion in Plant Biology** v. 8, p. 424-429, 2005.
- TOTH, I.K.; HYMAN, L.J.; WOOD, J.R. A one step PCR-based method for the detection of economically important soft rot *Erwinia* species on micropropagated potato plants. **Journal of Applied Microbiology**. v.87, n.1, p.158-166, 1999.
- URBAIN, W.M. **Food Irradiation**. Orlando, Florida: Academic Press, Inc 1986.
- van der VOSSEN, J.M.B.M; HOFSTRA, H. DNA based typing, identification and detection systems for food spoilage microorganisms: development and implementation. **International Journal of Food Microbiology** v.33, n.1, p.35-49, 1996.

VU, T.S.; SMOUT, C.; SILA,D.N.; LYNGUYEN,B.; van LOEY, A.M.L.; HENDRICKX, M.E.G. Effect of preheating on thermal degradation kinetics of carrot texture. **Innovative Food Science & Emerging Technologies** v.5, p.37-44, 2004.

WILLATS, W.G.T.; McCARTNEY, L.; MACKIE, W.; KNOX, J.P. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology** v.47, n.1-2, p.9-27, 2001.

WILLS, R.; McGLASSON, B.; GRAHAM, D.; JOYCE, D. **Postharvest: an introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamentals**. New York: CAB International, 1998. 262 p.

YANG, Z.; CRAMER, C.L.; LACY, G.H.; *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectic enzymes: *in planta* gene activation and roles in soft-rot pathogenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions** v.5, n.1, p.104-112, 1992.

ZÁRATE, N.A.H.; VIEIRA, M.C.; ARAÚJO, C. Perdas de peso no armazenamento de raízes de mandioquinha-salsa “Amarela de Carandaí”: efeito de tratamentos no cultivo e após a colheita. **Ciência e Agrotecnologia**. v.25, n.6. p.1337-1342, 2001.

ZÁRATE, N.A.H.; VIEIRA, M.C.; ARAÚJO, C. Perdas de peso no armazenamento de raízes de mandioquinha-salsa “Amarela do Carandaí”: efeito de tratamento no cultivo e após a colheita. **Ciência e Agrotecnologia** V.25, n.6, p.1337-1342, 2001.