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

**Alterações pós-colheita em raízes de mandioquinha-salsa
(*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.): atividade enzimática,
identificação de contaminante e caracterização parcial do amido**

Tatiana da Costa Raposo Pires

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Flavio Finardi Filho

São Paulo
2005

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011120

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P667a Pires, Tatiana da Costa Raposo
Alterações pós-colheita em raízes de mandioquinha-salsa
(*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.) : atividade enzimática,
identificação de contaminante e caracterização parcial do
amido. / Tatiana da Costa Raposo Pires. -- São Paulo,
2005.

158p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos
e Nutrição Experimental

Orientador: Finardi Filho, Flavio

I. Ciências dos alimentos I. T. II. Finardi Filho, Flavio
orientador

641 CDD

São Paulo
2005

Tatiana da Costa Raposo Pires

Alterações pós-colheita em raízes de mandioquinha-salsa
(*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.): atividade enzimática, identificação
de contaminante e caracterização parcial do amido

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Flavio Finardi Filho
Orientador/presidente

Prof. Tit. José Alfredo Gomes Arêas
1º Examinador

Prof. Dr. Eduardo Purgatto
2º Examinador

Profa. Dra. Carmen Cecília Tadini
3º Examinador

Prof. Dr. Valdir Augusto Neves
4º Examinador

São Paulo, 26 de agosto de 2005

“ Você vê coisas e diz: Por que?
mas eu sonho coisas que nunca existiram e digo: Por que não?”
George Bernard Shaw

À minha filha Estela que me ensinou a conhecer o verdadeiro amor.
À minha filha Manuela que está por vir, trazendo à flor da pele antigas e novas
sensações.
Ao Marcelo que sempre apoiou nos meus projetos e sonhos.

Agradecimentos

Os agradecimentos, eu deixei para o final. Foi um motivo de felicidade e de muito orgulho redigir esta lista, considerando que foram muitas as contribuições que recebi, não só durante a realização deste trabalho, mas durante toda a minha vida. De uma forma ou de outra, todos os que estiveram por perto, participando direta ou indiretamente do trabalho, uns mais próximos e outros menos, enfim, todos contribuíram para que eu chegasse até este ponto. Aprendi muito com todos e sei que ainda há muito que aprender.

Meus sinceros agradecimentos ao Professor Flavio Finardi Filho, pela orientação, apoio e confiança. Antes de orientador, um amigo. Devo a ele não só minha formação acadêmica, mas conselhos e exemplos que carregarei por toda a minha vida.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento de projetos que indiretamente beneficiaram este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pela contribuição à minha formação e pelo auxílio financeiro que possibilitou a apresentação de parte deste trabalho no IFT Annual Meeting 2005.

Ao Sr. Amélio Berti, Engenheiro Agrônomo do Núcleo de Produção de Sementes e Mudas de São Bento do Sapucaí, e ao Prudêncio Senaga, da Irmãos Senaga Ltda (CEAGESP), pelo fornecimento de amostras de raízes de mandioquinha-salsa, utilizadas neste trabalho.

Aos professores José Alfredo Gomes Arêas, Carmen Cecília Tadini e Eduardo Purgatto pelas preciosas sugestões e conselhos, não só durante o exame de qualificação, como também nas conversas “informais”.

Aos professores José Alfredo Gomes Arêas (FSP/USP) e Carmen Cecília Tadini (Poli-Química/ LEA/USP) e aos respectivos laboratórios por eles coordenados (alunos e funcionários), pela utilização do texturômetro.

A aluna e amiga Vanessa dos Santos Vieira (FCF/USP), sempre presente nos ensaios microbiológicos, dividindo sua experiência e seu conhecimento. E pela companhia no CBCTA 2004 – sem ela, o congresso não teria sido o mesmo.

Ao aluno Cristiano Andrigueto (FCF/USP), sempre presente nos ensaios moleculares, que acabaram não entrando no trabalho, mas que contribuíram enormemente para a minha formação. Não posso deixar de destacar um agradecimento especial para a Cynthia Doi, aluna de Iniciação Científica (FCF/USP). Foi minha mestre nos ensaios de biologia molecular que, infelizmente, não entraram neste trabalho. Meus sinceros agradecimentos aos dois.

A aluna e amiga Riana Heinemann, pelas discussões, conselhos e sugestões ao trabalho. E pela companhia e amizade durante estes três anos de curso – mesmo trabalhando em outro laboratório.

Às professoras Bernadette Franco, Mariza Landgraf e Maria Tereza Destro, pela colaboração e uso freqüente do laboratório de microbiologia (FCF/USP) e pelos seus valiosos conselhos e sugestões. À Kátia, técnica de laboratório, por tudo.

Aos professores, alunos e funcionários do Laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos (FCF/USP), pelas facilidades proporcionadas ao longo do trabalho.

Às professoras Deborah Bastos e Ana Maria Cervatto (FSP/USP) e Carmen Cecília Tadini (Poli Química/LEA/USP) pela orientação nos programas PAE (Programa de Aprimoramento de Ensino), fundamentais para a minha formação. Apreendi muito com vocês três.

Ao professor Pedro Kiyohara, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Física (USP), pela colaboração na realização dos testes de microscopia eletrônica de varredura do amido de mandioca.

A professora Inar Castro, pela realização de parte das análises estatísticas indispensáveis deste trabalho e pelas valiosas sugestões no preparo da apresentação do trabalho para o IFT Annual Meeting 2005.

Aos pesquisadores Gilmar Henz (EMBRAPA) e Valmir Duarte (UFRGS), pelas “conversas eletrônicas”, que contribuíram enormemente na elaboração do presente trabalho. Ao Gilmar, pelo envio das cepas de *Erwinia* e de sua tese de doutorado, indispensáveis.

Ao Professor John Whitaker (Universidade da Califórnia/Davis), pelas valiosas discussões, conselhos e sugestões ao trabalho.

À empresa National Starch e, especialmente, à Andréa Carvalho, amiga que abriu portas da companhia, possibilitando a utilização do Viscoamilograma Brabender.

À aluna Gerby Giovanna Rondan Sanabria, pela sua presença constante. Ao longo do trabalho, não conheci ninguém tão interessada e prestativa, sempre com uma disposição extraordinária. Gigi, acima de tudo, obrigada por ser quem você é.

Aos colegas de laboratório, de ontem e de hoje: Erika, Cláudio, Rodrigo, Cíntia, Patrícia, Luiz, Eliana, Mari, Cynthinha, Cris, Gigi, Joana, pela convivência agradável – e pelas festinhas “gostosas” ao longo deste período. Foi muito bom conviver com todos vocês.

A todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, que direta ou indiretamente participaram da elaboração deste trabalho.

Ao meu pai, Luiz Fernando, pela revisão do trabalho e pelas valiosas sugestões. E por estar sempre presente, mesmo morando em outra cidade. Sem você, este trabalho não seria o mesmo.

Agradecimentos especiais à Fátima, anjo da guarda da minha filha, e ao Marcelo, meu marido, sempre ao meu lado, me apoiando e torcendo por mim, com muito amor e paciência. Sem vocês, eu não conseguiria chegar até aqui.

A todos aqueles que estiveram ao meu lado, se preocupando e torcendo por mim. Muito obrigada.

ÍNDICE GERAL

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	v
Resumo	vii
Abstract	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
Capítulo 1 – Alterações enzimáticas e físico-químicas no período pós-colheita em raízes de mandioquinha-salsa (<i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancroft.)	7
1 – REVISÃO DA LITERATURA	8
1.1 – O amido	8
1.2 – Amilases	10
α -Amilase	10
β -Amilase	12
Glicoamilase	13
Determinação da atividade amilásica	13
1.3 – Pectina	15
Estrutura química da pectina	17
1.4 – Enzimas pectinolíticas	19
Enzimas de degradação das homogalacturonanas	20
a) Pectinesterase	20
b) Poligalacturonase	21
c) Pectato liase	23
Enzimas de degradação das ramnogalacturonanas	24
1.5 – Celulose	25
1.6 – Celulases	26

1.7 – Tempo de armazenamento de frutos e vegetais	27
2 – OBJETIVOS	30
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 – Materiais	31
Material vegetal	31
Reagentes	32
3.2 – Métodos	32
3.2.1 – Pectinesterase e poligalacturonase	32
Extrato enzimático	32
Atividade pectinesterásica	34
Atividade poligalacturonásica	34
Modelo experimental e análise de dados	35
Otimização do procedimento de extração de PE e PG de raízes de mandioquinha	35
Análise estatística: atividade PE e PG durante o período de armazenamento	36
3.2.2 – Extração e detecção de pectato liase	36
3.2.3 – Extração e detecção de celulase	37
3.2.4 – Extração e detecção de enzimas amilolíticas	38
3.2.5 – Determinação do teor de proteínas	39
3.2.6 – Determinação do teor de amido total	39
3.2.7 – Determinação do teor de açúcares redutores	39
3.2.8 – Alterações de textura: firmeza e energia de penetração	40
3.2.9 – Perda de peso das raízes durante o período de armazenamento	42
3.2.10 – Extração do amido de mandioquinha em diferentes estágios de armazenamento e observação em microscópio eletrônico de varredura	42

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 – Pectinesterase e poligalacturonase: otimização do processo de extração	43
Extração e detecção de atividade pectinesterásica (PE)	45
Extração e detecção de atividade poligalacturonásica (PG)	50
4.2 – Atividade PE e PG durante o período pós-colheita e alterações de textura	55
4.3 – Atividade pectato liásica	69
4.4 – Atividade celulásica	72
4.5 – Atividade amilolítica, amido total e açúcares redutores	75
4.6 – Perda de peso das raízes durante o período de armazenamento	81
4.7 – Microscopia eletrônica de varredura do amido de mandioquinha extraído em diferentes estágios de deterioração da planta	83
5 – CONCLUSÕES	86
 Capítulo 2 – Isolamento e identificação de <i>Erwinia</i> em raízes de mandioquinha-salsa (<i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancroft.)	 89
 1 – REVISÃO DA LITERATURA	 89
1.1 – Podridão-mole em raízes e tubérculos	89
2 – OBJETIVOS	94
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	95
3.1 – Materiais	95
Material vegetal	95
Reagentes	95

3.2 – Métodos	95
3.2.1 – Isolamento da bactéria de raízes de mandioquinha	95
3.2.2 – Identificação do microrganismo isolado através de testes bioquímicos e fisiológicos	96
3.2.3 – Identificação do microrganismo isolado através de técnica de PCR	96
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
4.1 – Identificação de espécie bacteriana em mandioquinha	98
4.2 – Identificação do microrganismo isolado através de técnica de PCR	102
5 – CONCLUSÕES	104
Capítulo 3 – Caracterização físico-química e reológica do amido de mandioquinha-salsa (<i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancroft.)	105
1 – REVISÃO DA LITERATURA	106
O amido de mandioquinha	106
2 – OBJETIVOS	110
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	111
3.1 – Materiais	111
Material vegetal	111
Reagentes	111
3.2 – Métodos	111
3.2.1 – Extração do amido	111
3.2.2 – Viscosidade	112
3.2.3 – Determinação do teor de amido total	112
3.2.4 – Determinação do teor de amilose	112
3.2.5 – Turbidez	113
3.2.6 – Microscopia eletrônica de varredura do amido de mandioquinha em diferentes estágios do processo de extração	113

3.2.7 – Formação do gel de amido	114
3.2.8 – Capacidade de retenção de água	115
3.2.9 – Análise de firmeza do gel	115
3.2.10 – Modelo experimental: MRS e análise de dados	116
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
4.1 – Extração do amido	117
4.2 – Viscosidade	118
4.3 – Determinação do teor de amido total e amilose	120
4.4 – Teor de amido total nos diferentes estágios de extração do amido de mandioquinha	121
4.5 – Turbidez	122
4.6 – Microscopia eletrônica de varredura do amido de mandioquinha em diferentes estágios do processo de extração	123
4.7 – Capacidade de retenção de água	125
4.8 – Análise de firmeza do gel	131
5 – CONCLUSÕES	135
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
Anexo 1	155

Lista de Figuras

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1 – Raízes de mandioquinha-salsa das variedades a) <i>Amarela de Senador Amaral</i> e b) <i>Amarela Comum</i> , a variedade tradicional	4

Capítulo 1 - Alterações enzimáticas e físico-químicas no período pós-colheita em raízes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.)

Figura 1 – Estrutura da amilose e da amilopectina em um grânulo de amido	9
Figura 2 – Unidade de ácido D-galacturônico	16
Figura 3 – Estrutura sistemática da molécula de pectina	18
Figura 4 – Fragmento de galacturana da pectina e pontos de ataque de enzimas pécticas	19
Figura 5 – Hidrólise da ligação metil-éster do ácido poligalacturônico da pectina	21
Figura 6 – Quebra da ligação glicosídica da pectina por hidrólise devido à ação de poligalacturonase	22
Figura 7 – Quebra da ligação glicosídica da pectina por β -eliminação devido à ação de pectato-liase	23
Figura 8 – Molécula de celulose	26
Figura 9 – Ilustração da morfologia da planta de mandioquinha-salsa	41
Figura 10 – Modelo de superfície de resposta para atividade PE (U) em função da concentração de NaCl e do pH do tampão de extração, a 28 h de extração	49
Figura 11 – Modelo de superfície de resposta para atividade PG (U) em função da concentração de NaCl e do pH do tampão de extração, a 52 h de extração	52
Figura 12 – Atividade PE e PG dos extratos preparados a pHs 3,5 a 8,5, sob as mesmas condições de concentração de NaCl (1,0 M) e de tempo de extração (4h)	54
Figura 13 – Respostas do MSR medidas <i>versus</i> valores previstos para a extração das enzimas PE (a) e PG (b) em mandioquinha-salsa	55

Figura 14 – Atividade PE (a) e PG (b) de raízes de mandioquinha durante o período pós-colheita, sob diferentes condições de estocagem	56
Figura 15 – Medida de energia de penetração das raízes tuberosas de mandioquinha durante o período pós-colheita, sob diferentes condições de estocagem	57
Figura 16 – Raízes de mandioquinha armazenadas à temperatura de refrigeração (a e c) e ambiente (b e d), sem embalagem, no terceiro e nono dias de armazenamento.	58
Figura 17 – Corte transversal de raízes de mandioquinha-salsa após quatro dias de armazenamento à temperatura ambiente, sob acondicionamento a vácuo	58
Figura 18 – Raízes de mandioquinha armazenadas à temperatura ambiente (25°C), sob acondicionamento a vácuo, durante 5 dias.	60
Figura 19 – Exemplos de testes de energia de penetração	67
Figura 20 – Raízes de mandioquinha armazenadas à (A) temperatura de refrigeração e (B ₁ e B ₂) ambiente, sob acondicionamento a vácuo, no quinto dia de armazenamento.	68
Figura 21 – Raízes de mandioquinha armazenadas à temperatura de refrigeração sob acondicionamento a vácuo, no nono dia de armazenamento	69
Figura 22 – Atividade pectato-liásica de raízes de mandioquinha-salsa durante o período pós-colheita, sob diferentes condições de armazenamento	71
Figura 23 – Atividade celulásica do extrato de raízes de mandioquinha-salsa durante o período de armazenamento, sob diferentes condições de estocagem	74
Figura 24 – Atividade amilásica (a), concentração de açúcares redutores (b) e teor de amido total (c) de raízes de mandioquinha-salsa durante o período pós-colheita, sob diferentes condições de estocagem	77
Figura 25 – Perda de peso (%) de raízes de mandioquinha-salsa durante o período pós-colheita, sob diferentes condições de estocagem	80
Figura 26 – Micrografia eletrônica de varredura do grânulo de amido de mandioquinha extraído em diferentes períodos de armazenamento	84

Capítulo 2 – Isolamento e identificação de *Erwinia carotovora* em raízes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.)

Figura 1 – Gel de agarose dos produtos de amplificação do DNA via PCR de fragmentos do gene de *Erwinia carotovora* 102

Figura 2 – Alinhamento dos genes de recombinase A em subespécies de *Erwinia carotovora* 103

Capítulo 3 – Caracterização físico-química e reológica do amido de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.)

Figura 1 – Viscoamilograma Brabender: medida de viscosidade do amido de mandioquinha extraído em escala laboratorial 119

Figura 2 – Teor de amido total (%) nos dez diferentes estágios de lavagem e centrifugação, durante o processo de extração do amido de mandioquinha. 122

Figura 3 – Micrografia eletrônica de varredura do grânulo de amido de mandioquinha extraído em diferentes estágios de centrifugação 124

Figura 4 – Modelo de superfície de resposta para a capacidade de retenção de água de géis de amido de mandioquinha, em função da temperatura de formação do gel e da concentração do amido, em pH 7,0 129

Figura 5 – Modelo de superfície de resposta para a firmeza de géis de amido de mandioquinha, em função da temperatura de formação do gel e da concentração de amido, a pH 7,0 132

Figura 6 – Respostas do MRS medidas *versus* valores previstos pelo modelo para a sinerese (a) e firmeza (b) dos géis de amido de mandioquinha-salsa 134

Anexo 1

Figura A – Interação entre os tratamentos para a atividade PE de raízes de mandioquinha, no terceiro dia de armazenamento (ANOVA Fatorial) 155

Figura B – Interação entre os tratamentos para a atividade PG de raízes de mandioquinha, no terceiro dia de armazenamento (ANOVA Fatorial) 156

Figura C – Interação entre os tratamentos para a determinação de firmeza (N) na região do xilema de raízes de mandioquinha, no terceiro dia de armazenamento (ANOVA Fatorial) 156

Figura D – Interação entre os tratamentos para a determinação de firmeza (N) na região do floema de raízes de mandioquinha, no terceiro dia de armazenamento (ANOVA Fatorial) 157

Figura E – Interação entre os tratamentos para a atividade AM de raízes de mandioquinha, no terceiro dia de armazenamento (ANOVA Fatorial) 157

Figura F – Interação entre os tratamentos para o teor de amido total de raízes de mandioquinha, no terceiro dia de armazenamento (ANOVA Fatorial)

Figura G – Interação entre os tratamentos para o teor de açúcares redutores de raízes de mandioquinha, no terceiro dia de armazenamento (ANOVA Fatorial)

Lista de Tabelas

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1 – Composição físico-química das raízes de mandioquinha-salsa	2
Capítulo 1 - Alterações enzimáticas e físico-químicas no período pós-colheita em raízes de mandioquinha-salsa (<i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancroft.)	
Tabela 1 – Métodos de detecção de atividade amilolítica, reações químicas e descrição da metodologia	14
Tabela 2 – Condições de extração enzimática para PE e PG em raízes de mandioquinha-salsa: valores codificados e reais	33
Tabela 3 – Condições de extração de PE de diferentes frutas e vegetais, citados na literatura	44
Tabela 4 – Condições de extração de PG de diferentes frutas e vegetais, citados na literatura	45
Tabela 5 – Atividade PE e PG dos extratos de mandioquinha-salsa	46
Tabela 6 – ANOVA para a atividade PE em função da concentração de NaCl (x_1), do pH (x_2) e do tempo de extração (x_3) de diferentes extratos de raízes tuberosas de mandioquinha	47
Tabela 7 – Efeitos estimados, erro padrão e valor t dos dados experimentais referentes à atividade PE de raízes de mandioquinha	47
Tabela 8 – ANOVA para a atividade PG em função da concentração de NaCl (x_1), do pH (x_2) e do tempo de extração (x_3) de diferentes extratos de raízes tuberosas de mandioquinha	51
Tabela 9 – Efeitos estimados, erro padrão e valor t dos dados experimentais referentes à atividade PG de raízes de mandioquinha	51
Tabela 10 – Tamanho e diâmetro das raízes de mandioquinha-salsa, para a determinação da firmeza, armazenadas sob diferentes condições	63
Tabela 11 – Variação do tamanho dos grânulos de amido de mandioquinha, observados em microscopia eletrônica de varredura	85

Capítulo 2 – Isolamento e identificação de *Erwinia carotovora* em raízes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.)

Tabela 1 – Testes bioquímicos e fisiológicos para a identificação de <i>Erwinias</i> pectinolíticas	99

Capítulo 3 – Caracterização físico-química e reológica do amido de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.)

Tabela 1 – Composição do amido de mandioquinha	107
Tabela 2 – Propriedades físicas, físico-químicas e reológicas do amido de mandioquinha	108
Tabela 3 – Condições de formação do gel de amido de mandioquinha: valores em escala e reais	114
Tabela 4 – Características do amido de mandioquinha: rendimento do processo de extração, teor de amido total e de amilose	117
Tabela 5 – Viscoamilograma Brabender: parâmetros reológicos expressos em Unidades Brabender (UB) para o amido de mandioquinha	119
Tabela 6 – Efeito do armazenamento na turbidez da solução de amido de mandioquinha	123
Tabela 7 – Condições de formação do gel de amido de mandioquinha: valores reais e resultados experimentais (sinerese e firmeza dos géis de amido)	128
Tabela 8 – ANOVA para a capacidade de retenção de água de géis de amido de mandioquinha em função da concentração do pH (x_1), da temperatura (x_2) e da concentração de amido (x_3) utilizados no preparo dos géis	130
Tabela 9 – Efeitos estimados, erro padrão e valor t dos dados experimentais referentes à sinerese de géis de amido de mandioquinha	130
Tabela 10 – ANOVA para a firmeza de géis de amido de mandioquinha em função da concentração do pH (x_1), da temperatura (x_2) e da concentração de amido (x_3) utilizados no preparo dos géis	133
Tabela 11 – Efeitos estimados, erro padrão e valor t dos dados experimentais referentes à firmeza de géis de amido de mandioquinha	133

RESUMO

Este trabalho teve como principais objetivos verificar as alterações na atividade de enzimas amilolíticas, pectinolíticas e celulásicas em raízes de mandioquinha-salsa durante o período pós-colheita, sob diferentes condições de armazenamento, visando avaliar os mecanismos de deterioração das raízes, bem como identificar o microrganismo possivelmente responsável pela alta perecibilidade das raízes. Além disso, foram estudadas características físico-químicas e reológicas do amido de mandioquinha extraído em laboratório. Para a detecção de atividade pectinesterásica (PE) e poligalacturonásica (PG) nas raízes, os parâmetros de extração destas enzimas foram otimizados através de metodologia de superfície de resposta (MSR). As enzimas apresentaram pH ótimo de extração de 7,5 e 4,0 para a PE e PG, respectivamente, sendo os outros parâmetros, como tempo de extração e concentração de NaCl, considerados como não-significativos pelo modelo. As enzimas pectinolíticas parecem estar relacionadas à deterioração das raízes durante o armazenamento, associadas ao amolecimento das raízes. Devido à alta produção de gás, sob condições de temperatura e embalagem, a presença de bactérias produtoras de enzimas pécticas e causadoras de podridão-mole pode ser uma das principais causas da alta perecibilidade das raízes. A atividade amilolítica apresenta um importante papel na deterioração da mandioquinha uma vez os açúcares redutores provenientes da hidrólise do amido podem vir a ser substrato para o ataque de microrganismos oportunistas. Representa um dos principais aspectos metabólicos em um tubérculo rico em amido. A atividade celulásica foi praticamente nula durante o armazenamento. A melhor forma de conservação das raízes ocorreu à temperatura de refrigeração, sob acondicionamento a vácuo. O microrganismo isolado das raízes foi identificado através de provas bioquímicas como *Erwinia carotovora* subsp. *odorífera*. Em relação às características físico-químicas, o amido de mandioquinha apresentou um teor de amilose abaixo dos valores determinados para cereais e raízes convencionais (12,1 %) e uma boa estabilidade durante a cocção, analisada através da determinação de viscosidade. A turbidez das suspensões de amido também apresentou estabilidade durante o armazenamento, assim como a sinerese, que em condições ótimas de preparação do gel apresentou

2,53 % de expulsão de água. Ainda sobre a relação água/gel, o pH da solução e a concentração de amido influenciam significativamente a capacidade de retenção de água, enquanto a temperatura de formação do gel não se mostrou um parâmetro significativo. A textura das preparações de amido foi influenciada significativamente pela temperatura de formação do gel e pela concentração de amido utilizada na preparação. O conhecimento de algumas características reológicas e de propriedades físico-químicas do amido de mandioca, visando a aplicação como ingrediente alimentício, pode ser uma alternativa a utilização das raízes *in natura*, principalmente no que diz respeito ao excedente de safra e ao aproveitamento de raízes com baixo valor comercial.

ABSTRACT

The aim of this work was to verify the changes in amylolytic, pectinolytic and cellulosic activity in Peruvian carrot roots after harvest, under different storage conditions, in order to evaluate the deteriorative mechanisms of the roots, as well as to identify the microorganism possible responsible to its low conservation time. In addition, physico-chemical and rheological characteristics of Peruvian carrot starch were studied. For pectinesterase (PE) and poligalacturonase (PG) detection on the roots, the extraction parameters of both enzymes were optimized by response surface methodology. The enzymes presented the optimum pH values at 7.5 and 4.0 for PE and PG, respectively. Extraction time and NaCl concentration were considered non-significant by the model. Pectic enzymes seems to be related to the deterioration process of Peruvian carrot, that is associated to the root softening. Considering the high volume of gas under specific packing and temperature, the presence of microorganisms soft rot promoters could be the main cause of the high perecibility of the roots. The amylolytic enzymes present an important role on Peruvian carrot deterioration related to the starch hydrolysis and the releasing of reducing sugars, substrate for opportunistic microorganisms. The cellulosic activity was not significant during storage time. Best conditions for roots conservation occurred at 4°C and under vacuum package. The bacteria isolated from the roots were identified by biochemical reactions as *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera*. Peruvian carrot starch presented low values of amylose content (12.1%) in comparison to other starch sources and a good stability during cooking, analyzed by viscoamylogram Brabender. The turbidity of starch suspensions presented good stability during storage, as well as water holding capacity, which presented 2.53% in optimal conditions of gel preparation. Syneresis is positively influenced by the pH of past solution and starch concentration whereas temperature of gel formation was not significant. Texture of starch preparations was significant influenced by temperature of gel formation as well as starch concentration. The knowledge of some rheological and physico-chemical properties of Peruvian carrot starch can be useful focusing its use as a food ingredient, which can be an alternative to the consumption of the roots *in nature*, especially considering crop excesses and low commercial value roots.

INTRODUÇÃO GERAL

A mandioquinha-salsa ou batata baroa é, provavelmente, a planta mais antiga cultivada na América do Sul. Corresponde ao gênero *Arracacia*, espécie *xanthorrhiza*, descrita por Bancroft em 1825, e pertence à família *Umbelliferae* (Apisciae). Originária dos Andes, é cultivada no Brasil na região centro-sul, principalmente em áreas de elevada altitude e clima ameno (Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo e São Paulo), onde ocorrem condições climáticas similares às de seu local de origem (Casali & Sedyama, 1997; Leonel & Cereda, 2002).

A mandioquinha-salsa é uma raiz comercializada, normalmente, *in natura*, podendo ser consumida cozida, frita ou em forma de purês, sopas e alimentos infantis, com o uso culinário bastante difundido no Brasil. Caracteriza-se como alimento essencialmente energético devido ao seu alto teor de carboidratos, apresentando níveis consideráveis de vitamina A, niacina, cálcio, fósforo e ferro (Pereira, 1995). Dos carotenóides presentes, a maior fração corresponde ao beta-caroteno, sendo também encontrado o gama-, o zeta- e o beta-zeta-caroteno (Almeida & Penteado, 1987). A Tabela 1 mostra a composição físico-química das raízes de mandioquinha.

A conservação da mandioquinha-salsa é, no entanto, um ponto crítico na sua comercialização. Comparativamente ao seu ciclo de cultivo, que varia de 10 a 12 meses para a variedade tradicional (Cv. *Amarela Comum*), as raízes tem um período curto de conservação pós-colheita, no máximo de sete dias, quando mantidas à temperatura ambiente. Este fato tem implicações diretas no manuseio, na distribuição, e na disponibilidade do produto, e faz com que os preços sofram flutuações acentuadas ao longo do ano (Henz, 1995; Pereira, 1995; Santos, 1997).

Tabela 1 – Composição físico-química das raízes de mandioquinha-salsa (Leonel & Cereda, 2002).

Elementos	Quantidade
Umidade ¹	79,70 ± 0,15
Amido ¹	15,75 ± 0,04
Açúcares solúveis totais ¹	1,34 ± 0,02
Açúcares redutores ¹	0,36 ± 0,01
Fibras ¹	0,38 ± 0,06
Proteínas ¹	0,56 ± 0,06
Cinzas ¹	1,03 ± 0,02
pH	5,94 ± 0,04
Acidez titulável ²	10,69 ± 0,28

¹ % em base úmida

² mL de NaOH 1 N / 100 mL

A raiz de mandioquinha, como qualquer outra raiz comestível, é um órgão vivo, retirado do solo e destacado da planta em plena atividade metabólica. Os principais fatores que podem acelerar a deterioração dos produtos de origem vegetal são a taxa de respiração e de transpiração, e doenças associadas ao ataque de microrganismos. 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.

As principais razões que respondem pela difícil comercialização das raízes de mandioquinha-salsa são de natureza agrônômica, como o seu longo ciclo de cultivo, citado anteriormente, sobretudo quando comparado a batatas e a outros tipos de tubérculos. Mas existem ainda alguns outros fatores: lignificação das raízes na maturidade, susceptibilidade a pestes e doenças – como *Alternaria* sp., *Erwinia* spp. e *Rhizoctonia crocorum*, e lesões a nematóides, como o *Pratylenchus penetrans*, que causa necrose – e a conseqüente dificuldade de se estocar as raízes (Herman, 2004). As perdas pós-colheita afetam consideravelmente as margens de comercialização da mandioquinha. Geralmente embutidas no preço final do produto, as porcentagens de perdas são repassadas aos consumidores pelas redes de comercialização, o que resulta no encarecimento do produto (Santos, Carmo & Vilela, 1998).

A podridão-mole 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). Embora alguns aspectos relacionados à deterioração pós-colheita das raízes já estejam estabelecidos, como a perda de matéria fresca e a degeneração provocada por microrganismos, os mecanismos de degradação da mandioquinha-salsa ainda não são suficientemente conhecidos.

A ação dos diversos grupos de enzimas endógenas na mandioquinha-salsa ainda não é totalmente conhecida, ao contrário de outros tubérculos, similares a ela quanto ao alto teor de amido observado em sua composição, como a mandioca (Matos da Veiga, 2002; Padmaja & Balagopal, 1985), a batata (Cho & Ahn, 1999; Kahn, 1981), o inhame (Oluoha & Ugochukwu, 1995) e a batata doce (Hagenimana et al., 1994). Poucos estudos relacionados à participação de enzimas endógenas na deterioração destas raízes foram realizados até agora. Pires (2002) caracterizou parcialmente as enzimas amilolíticas presentes no extrato aquoso de mandioquinha-salsa e concluiu que essas enzimas não são as principais responsáveis pelo processo de degradação das raízes. No entanto, este grupo de enzimas pode estar atuando em conjunto com outros grupos de enzimas endógenas, durante a fase de armazenamento, contribuindo para a deterioração das raízes e provocando, inclusive o seu amolecimento.

Durante a estocagem, as raízes de mandioquinha apresentam um amolecimento gradual do tecido, que pode estar relacionado à ação de enzimas responsáveis pelos processos de amolecimento e senescência de frutas e vegetais (Alonso, Rodríguez & Canet, 1995). 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 frutas e vegetais. Mesmo no caso de doenças relacionadas à pós-colheita, como no caso da podridão-mole, provocada 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. Até então, nenhum estudo fora realizado com o propósito de identificar as alterações na atividade destas enzimas, durante o período de armazenamento das raízes de mandioquinha.

Além da necessidade de se conhecer as vias de deterioração pós-colheita das raízes de mandioquinha, outro aspecto relevante seria o estudo do

processamento das raízes com vistas a ampliar os seus horizontes de comercialização. No Brasil, a área plantada de mandioquinha-salsa é de 16 mil hectares, que reúne cerca de nove mil produtores, 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. O país é um dos maiores produtores da planta, sendo os estados de Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e Espírito Santo os que mais cultivam e o Estado de São Paulo, o que mais consome suas raízes. 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* (Figura 1a), desenvolvida mediante a seleção de clones originários de sementes botânicas, coletadas no sul de Minas Gerais, oriundas do material tradicionalmente cultivado. A 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, 2004).

Figura 1 – Raízes de mandioquinha-salsa das variedades a) *Amarela de Senador Amaral*, desenvolvida pela EMBRAPA, de formato cilíndrico e cor amarela-clara e b) *Amarela Comum*, a variedade tradicional, de cor amarela intensa e formato cônico.
Fonte: CEASA MINAS, 2004.

A variedade *Amarela de Senador Amaral* atinge até 25 toneladas por hectare, contra as 8 toneladas de produção, alcançadas pela variedade tradicional, a *Amarela Comum* (Figura 1b), 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, 2002; CNPH-Embrapa, 2004). Em 2001, cerca de 1.500 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 (CNPQ-Embrapa, 2004). Em 2003, foi divulgada uma nota sobre o aumento da produtividade da mandioquinha-salsa em São Bento do Sapucaí (SP). Um projeto desenvolvido em parceria com o Núcleo de Produção de Sementes e Mudanças 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* (CATI, 2004).

Segundo Prudêncio Senaga, da *Irmãos Senaga Ltda*, que comercializa mandioquinha-salsa no CEAGESP, o aumento da produtividade da mandioquinha, graças ao plantio da nova variedade, entusiasmou tanto os agricultores que, com os lucros gerados em 2003, resolveram elevar a produtividade para o ano subsequente. O aumento foi tal que o resultado ultrapassou a demanda das raízes no mercado, gerando excesso de safra. Além disso, 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 constataram a desvalorização do preço da mandioquinha (comercializada em caixas) em razão do aumento da produção.

O aumento da produtividade das raízes com a implantação dessa nova variedade foi um grande passo, em particular no caso da mandioquinha, onde pequenos e médios produtores e, em muitos casos, os sistemas de agricultura familiar, foram beneficiados. Este excesso de safra não deve ser considerado como prejuízo. Se os produtores resolverem diminuir a produção para que o excedente não ocasione alterações nos preços de mercado, a decisão representaria um retrocesso frente aos avanços tecnológicos alcançados.

Uma alternativa à problemática do excesso de safra da mandioquinha-salsa seria o processamento das raízes frescas, na forma de amido, realizada pelos próprios produtores, que poderiam processar o excedente – ou mesmo as raízes com baixo ou nenhum valor comercial – e lucrar com a venda de um amido alternativo ao amido de mandioca ou de batata, que são os mais consumidos. Sobre

esse aspecto, alguns recursos são subutilizados no Brasil e no restante do mundo, como é o caso da mandioquinha-salsa (Santacruz *et al.*, 2002). Além disso, o processamento do amido de mandioquinha também pode constituir-se como alternativa à utilização das raízes *in natura*, que apresentam alta perecibilidade, como abordado anteriormente.

O processamento das raízes não é comum na maioria dos países onde a planta é cultivada. Segundo Cereda (2001), a mandioquinha-salsa é uma matéria-prima de grande potencial como fonte de amido. O estabelecimento da potencialidade de uma cultura a ser comercializada na forma de amido é feito, inicialmente, em laboratório, para fins de determinação de seu rendimento. Além disso, estudos relacionados às propriedades físico-químicas do amido também são necessários para avaliar as suas potenciais aplicações como ingrediente alimentício.

Este trabalho teve como principal objetivo identificar as alterações na atividade de enzimas amilolíticas, pectinolíticas e celulásicas durante o período pós-colheita das raízes de mandioquinha, armazenadas sob diferentes condições de temperatura e embalagem. O isolamento do microrganismo responsável, em parte, pelas perdas pós-colheita da mandioquinha, foi realizado neste estudo. Além disso, foram estudadas as características físico-químicas e reológicas do amido de mandioquinha extraído em laboratório, visando a sua aplicação tecnológica, como alternativa à comercialização das raízes, que hoje ocorre somente *in natura*.

Capítulo 1

Alterações enzimáticas e físico-químicas no período pós-colheita em raízes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.)

Capítulo 1 – Alterações enzimáticas e físico-químicas no período pós-colheita em raízes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.)

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 – O amido

Em todas as culturas, sociedades e civilizações, o amido tem sido a maior fonte de energia utilizada pelo homem. É o principal carboidrato de reserva sintetizado por plantas superiores e constitui uma fonte de energia essencial à maioria dos organismos vivos (Núñez-Santiago *et al.*, 2004). O amido extraído pode ser utilizado como ingrediente alimentício ou como matéria-prima, com diferentes aplicações industriais. É um polímero versátil e útil, não somente pelo baixo custo de extração e ser uma matéria-prima natural, mas também devido a suas propriedades físico-químicas, que podem ser alteradas via tratamento químico, físico e/ou enzimático (Jobling, 2004).

O amido é um polímero relativamente simples, composto por moléculas de glicose e organizado em grânulos, cuja morfologia, composição química e o arranjo das macromoléculas em estado sólido, são característicos de sua fonte botânica (Núñez-Santiago *et al.*, 2004). Seu grânulo compreende dois diferentes polímeros de glicose: a amilose e a amilopectina. A primeira representa cerca de 20-30% da composição do amido, é uma molécula linear, formada por ligações glicosídicas α -1,4, enquanto a amilopectina, o maior componente do amido (70-80%), é composta também por moléculas de glicose unidas por ligações α -1,6 nos pontos de ramificação (Figura 1) (Tester *et al.*, 2004). A cadeia linear da amilose forma complexos de cor azul com soluções aquosas de iodo-iodeto, à temperatura ambiente. Essa ligação com o amido permite a determinação do teor de amilose de amidos nativos, pois a capacidade da molécula de amilopectina de incorporar o iodo é menor que 1% (Parker & Ring, 2001).

Figura 1 – Estrutura da amilose e da amilopectina em um grânulo de amido (Tester *et al.*, 2004).

A composição e a estrutura dos grânulos de amido variam consideravelmente entre as plantas, o que afeta as suas propriedades e funcionalidades, assim como a susceptibilidade ao ataque enzimático (Núñez-Santiago *et al.*, 2004). Amidos provenientes de tubérculos possuem grânulos maiores e teores de proteínas e lipídios menores, quando comparados a amidos de cereais. Após o processamento, os amidos tuberosos formam pastas claras e com sabor suave, o que apresenta uma vantagem quando aplicados em produtos alimentícios (Jobling, 2004).

A temperatura de gelatinização do amido varia de 60 a 85°C, conforme sejam os fatores que a influenciam, como a fonte de amido, as proporções de amilose e amilopectina, e a quantidade de umidade disponível para a hidratação dos grânulos. A retrogradação é o processo inverso, que tende a reverter o amido gelatinizado a uma estrutura parcialmente cristalina sob condições favoráveis, como a refrigeração (Tester *et al.*, 2004; Alavi, 2003). Durante o processo de retrogradação, a cadeia de amilose forma associações dupla-hélice de 40-70 unidades de glicose. Quanto maior o teor de amilose do amido, maior a sua tendência à retrogradação – processo indesejável durante o armazenamento de alimentos, uma vez que está relacionado à exudação de água de preparações alimentícias (Singh *et al.*, 2003).

Nas indústrias de alimentos, o amido é utilizado como ingrediente, aditivo, ou como coadjuvante de tecnologia. No setor frigorífico, é usado como coadjuvante, pois promove uma maior absorção de água pelo produto, deixando-o mais macio e

propiciando maiores rendimentos a custos mais baixos; na indústria de biscoitos pode substituir, em parte, a farinha de trigo, tornando-os mais leves e saborosos; em massas (macarrão), o uso de amido diminui o tempo de cocção, o que eleva o rendimento da pasta devido à absorção de água; na indústria de sobremesas, pode substituir o uso de gomas em algumas formulações; em iogurtes, melhora a cremosidade do produto; na indústria de panificação, o produto obtido apresenta coloração mais clara e o amido promove um retardamento no envelhecimento do pão, maior absorção de água pela massa e obtenção de um miolo com maior teor de umidade; na fabricação de balas e caramelos, é usado para absorver a umidade dos moldes e, em molhos e sopas, é um excelente agente espessante (Cereda, 2001).

1.2 – Amilases

As amilases são enzimas que catalizam a degradação do amido e de polissacarídeos derivados. Podem ser subdivididas em vários tipos, dependendo de seu modo de ação (endógenas ou exógenas), da retenção ou inversão da configuração, da hidrólise da ligação glicosídica α -1,4 ou α -1,6, e do tipo de reação (transferência ou hidrólise) (Whitaker, 1994).

α -Amilase

α -Amilases (1,4- α -D-glucan glucanohidrolase, EC 3.2.1.1) são endoglucanases que catalizam a quebra de ligações α -1,4-D-glicosídicas internas no amido e em polissacarídeos derivados de maneira essencialmente aleatória, produzindo dextrinas e oligossacarídeos (Wong & Robertson, 2003a). A designação α -amilase deve-se ao fato dos produtos de degradação serem açúcares com a configuração óptica α (Greenwood & Milne, 1968). A enzima ocorre naturalmente em plantas superiores, tecidos animais e microrganismos, e seu modo de ação depende não só da natureza do substrato como da natureza da enzima em questão (Suckling, 1990).

O peso molecular da maioria das α -amilases é em torno de 50 kDa e contém, pelo menos, um íon Ca^{+2} por molécula de proteína, cuja presença é essencial para a estabilização da enzima (Wong, 1989). Com a completa remoção do cálcio, que pode ser realizada por meio do uso de agentes quelantes, tais como oxalato, citrato,

polifosfato, EDTA ou através de diálise, a enzima torna-se inativa (Hagenimana *et al.*, 1994).

A α -amilase, utilizada no processamento de alimentos, é obtida mediante a fermentação controlada de microrganismos que contém o gene da α -amilase (*Bacillus stearothermophilus* ou *Bacillus subtilis*). As aplicações típicas da enzima incluem preparações de xarope de amido, dextrose, álcool, cerveja e produtos de panificação. A α -amilase é utilizada para fins industriais na liquefação do amido para a produção de dextrinas, as quais são posteriormente sacarificadas por glicoamilases para a produção da glicose a ser empregada na fabricação de xarope de milho, etanol combustível ou para a produção de bebidas alcoólicas. Na indústria de panificação, é adicionada à massa para assegurar o fornecimento contínuo de açúcares fermentativos para o crescimento das leveduras e conseqüente produção de gás (Wong & Robertson, 2003a).

Existem diferentes métodos de detecção de atividade α -amilásica. Eles se baseiam, principalmente: a) na quantificação do aumento de grupos redutores ou de fragmentos produzidos pela ação da hidrólise da enzima no amido. Os açúcares redutores podem ser detectados através do método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, onde a concentração do ácido nitroaminosalicílico, formado no grupo hemiacetal redutor, é medida colorimetricamente (Bernfeld, 1955). Por este método, a quantificação da atividade α -amilásica só é segura se na amostra não estiverem presentes outros tipos de enzimas amilolíticas (Wong & Robertson, 2003a). Os grupos redutores também podem ser determinados pelo método de Nelson-Somogyi (Nelson, 1944; Somogyi, 1952), que embora seja um método sensível, requer cuidados durante a manipulação dos reagentes; b) na leitura direta da solução colorida como resultado da liberação de dextrinas coloridas. Um amido corado de baixa solubilidade ao ser hidrolisado pela α -amilase libera fragmentos solúveis coloridos, portanto não sendo afetado pela presença de grupos redutores. Estes substratos estão disponíveis comercialmente ou podem ser sintetizados em laboratório. Um exemplo deste tipo de substrato é o amido marcado com corante através de ligações cruzadas, (*dye-labeled crosslinked starch*), onde o substrato forma uma rede insolúvel de polímeros que, umedecidos em água ou em solução tampão, formam uma suspensão. Uma grande vantagem deste tipo de quantificação é a resistência do substrato à hidrólise da β -amilase. O amido de ligações não-

cruzadas, marcado com corante (*dye-labeled non-crosslinked starch*), é um substrato solúvel, susceptível à ação da β -amilase e, portanto, não é um método específico para a α -amilase (Wong & Robertson, 2003a);

c) na utilização de um substrato de estrutura definida pelo emprego de oligossacarídeos sintéticos de baixo peso molecular, cuja vantagem é a eliminação da variabilidade do substrato. Entretanto, este substrato não é natural e a atividade enzimática pode ficar comprometida (Wong & Robertson, 2003a).

β -Amilase

A presença de β -amilase (1,4- α -D-glucan maltohidrolase, EC 3.2.1.2) é limitada a plantas superiores e a bactérias, não ocorrendo, portanto, em mamíferos (Bemiller & Whistler, 1996). É uma exo-enzima que catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas 1,4- α -D em amido e glicogênio, com inversão na configuração da glicose sobre a posição C (1) de α para β , razão pela qual a enzima é caracterizada como β (Guzmán-Maldonado & Paredes-López, 1995; Wong, 1989).

Em geral, as β -amilases apresentam maior peso molecular em relação às α -amilases, que pode chegar a 215 kDa em batata doce (Greenwood & Milne, 1968). Ao contrário das α -amilases, as β -amilases não necessitam de metais para a manutenção de sua estabilidade. Entretanto, podem sofrer alterações em sua atividade enzimática devido à presença de íons (Wong, 1989). Em relação a inibidores, a α -ciclodextrina é um inibidor competitivo, que se complexa com a enzima, bloqueando fisicamente o seu sítio ativo (Wong & Robertson, 2003b).

A indústria de amido utiliza a β -amilase na produção de xaropes com alto teor de maltose que, comparado ao xarope de glicose, apresenta maior viscosidade, menor grau de higroscopicidade, menor tendência à cristalização e maior resistência ao escurecimento – por esses motivos, tem maior aceitabilidade nas indústrias de balas e de panificação (Wong & Robertson, 2003b).

Para a detecção da atividade β -amilásica, o uso de *p*-nitrofenil α -maltopentosídeo, como substrato específico, tem sido empregado em razão de sua cadeia ser curta para a hidrólise efetiva, realizada pela α -amilase proveniente de cereais. No entanto, este substrato pode sofrer o ataque de outros tipos de α -amilases, provenientes de microrganismos (Wong & Robertson, 2003b).

Glicoamilase

A glicoamilase [α -(1,4)-D-glucan glicohidrolase, EC 3.2.1.3, GA], conhecida industrialmente como amiloglicosidase, hidrolisa o amido e seus derivados a partir da extremidade não redutora da cadeia, sendo a glicose o produto da reação, o que a diferencia das amilases α - e β -. A enzima é produzida, apenas, por microrganismos, e, por isso, não é considerada um fator importante em alimentos processados. No entanto, tem papel relevante no processamento de alimentos e é utilizada, por exemplo, na sacarificação do arroz e da batata cozidos e no arroz rico em amilopectina. No Japão, é muito utilizada na fabricação de molho a base de soja e sakê. Sua forma purificada é amplamente empregada na produção de xaropes de glicose, a partir de maltodextrinas (Reilly, 2003).

A atividade glicoamilásica é facilmente determinada, pois a enzima produz, exclusivamente, glicose, que pode ser determinada através do uso da glicose oxidase (Reilly, 2003).

Determinação de atividade amilásica

A maioria dos parâmetros enzimáticos relacionados à determinação quantitativa da atividade amilolítica já foram estudados e muitas alterações já foram sugeridas, incluindo o aumento ou a diminuição do tempo de incubação e/ou a variação do tipo e da concentração do substrato, entre outros, o que mostra a insatisfação geral de pesquisadores a respeito da utilização dos métodos existentes para a detecção de atividade amilolítica (Bassinello *et al.*, 2002).

Os métodos mais comumente utilizados na detecção de atividade amilolítica podem ser subdivididos em três grandes grupos: aminoclástico, sacarogênico e cromogênico (Tabela 1) (Okuda *et al.*, 1988). No entanto, os resultados obtidos nem sempre revelam o produto, predominantemente formado a partir da hidrólise do amido (Bassinello *et al.*, 2002). O método aminoclástico mede a degradação do amido por análises viscosimétricas, turbidimétricas ou iodométricas, enquanto os métodos sacarogênicos medem diretamente a hidrólise do amido, uma vez que a quantificação é feita através do número de grupos redutores formados. Os métodos cromogênicos baseiam-se na liberação do corante solúvel ligado ao substrato (McCleary *et al.*, 1987; Okuda *et al.*, 1988; Ohnishi *et al.*, 1988; Sinner *et al.*, 1978).

Bassinello *et al* (2002) aplicou diferentes métodos de detecção de atividade amilolítica em bananas, comparando sua eficiência. Quando comparado ao DNS, o método iodométrico mostrou-se mais sensível, detectando atividade hidrolítica mesmo em extratos que não haviam sofrido dessalinização.

Tabela 1 – Métodos de detecção de atividade amilolítica, reações químicas e descrição da metodologia¹.

Método	Substrato	Princípio de reação	Detecção
DNS	Amido nativo ou solúvel	Método sacarogênico Redução do ácido alcalino 3,5-dinitrosalicílico a 3-amino-5-nitrosalicílico	Espectrofotometricamente
Ceralpha	BPNPG7 ²	Métodos cromogênicos Ataque endolítico seguido de α -glicosidase/glicoamilase em parte do p-NP, liberação de p-NP	Espectrofotometricamente
Betamyl	PNPG5 ³	Ataque exolítico e ação da α -glicosidase em parte do p-NP, liberação de p-NP	Espectrofotometricamente
Amido colorido	Amilose-azure ⁴	Liberação de cor azul devido à hidrólise da amilose	Visualmente ou Espectrofotometricamente
Iodométrico	Amido ou amilose	Método amiloclástico Hidrólise do complexo amilose-iodo, redução do complexo e cor azul	Espectrofotometricamente

¹ Adaptado de Bassinello *et al.*, 2002. ²p-nitrofenol-maltoheptaose bloqueado. ³p-nitrofenol-maltoheptaose. ⁴Amilose marcada com corante remazol brilhante blue.

1.3 – Pectina

Pectinas são carboidratos complexos, encontrados na parede celular de plantas. Desempenham a função de polissacarídeo estrutural no meio da lamela e na parede celular primária de plantas, e se sobressaem no tecido parenquimático. Executam diversas funções na parede celular de tecidos vegetais, dentre elas atividades fisiológicas relacionadas ao crescimento, à determinação do tamanho e forma da célula, da integridade e rigidez dos tecidos, do transporte de íons, absorção de água, e do mecanismo de defesa contra infecções patogênicas na planta (Thibault & Ralet, 2001; Voragen *et al.*, 2001).

Como não são metabolizadas pelo trato intestinal humano, são classificadas como fibras. Este fato desperta o interesse dos nutricionistas e das indústrias de alimentos, não só devido à dieta fibrosa, mas também ao seu potencial de diminuição dos níveis de colesterol no sangue. As pectinas também afetam o metabolismo da glicose, na qual diminuem a resposta na curva glicêmica. Fazem parte de nossa dieta quando consumidas tanto como frutas e vegetais, quanto como ingrediente em produtos alimentícios enriquecidos com pectina, para uma dieta rica em fibra, ou como aditivo em alimentos manufaturados, como geléias cítricas. As pectinas também possuem propriedades nutraceuticas, atuando como desintoxicante, regulador e protetor do trato gastro-intestinal, entre outras (Voragen *et al.*, 2001).

A estrutura dominante da pectina é uma cadeia linear de ácidos-D-galacturônicos (Figura 2), unidos por ligações α -1,4, os quais variam de acordo com os grupos ácidos presentes na forma de ésteres metílicos. Estão geralmente associados a açúcares neutros, como a arabinose, o arabinogalactano e o galactano. Por definição, 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 (Figura 2). Os grupos carboxílicos podem estar presentes na forma de ácidos livres ($-\text{COOH}$) ou sais ($-\text{COO}^-\text{Na}^+$). Pectinas que possuem menos da metade de seus grupos carboxílicos na forma de éster metílico são chamadas pectinas com baixo grau de metoxilação. Pectinas com alto grau de metoxilas formam gel na presença de açúcares ou polióis, em meio ácido, enquanto pectinas com baixo teor de metoxilas formam gel somente na presença de cátions

divalentes (Voragen *et al.*, 2001; Pérez & Kouwijzer, 1999; BeMiller & Whistler, 1996).

Figura 2 – Unidade de ácido D-galacturônico, estrutura dominante da cadeia linear de pectina. Fonte: IPPA, 2004.

As propriedades físico-químicas, assim como a matriz da parede celular após a extração, são importantes tanto do ponto de vista funcional como nutricional. Além disso, as pectinas têm um papel fisiológico na dieta fibrosa no trato digestivo humano e, no alimento, exibe uma série de propriedades funcionais, a maioria relacionada à textura. Como molécula isolada, a pectina tem propriedades físico-químicas, como viscosidade, gelatinização e troca iônica, numa relação estreita com suas características químicas. A parede celular, rica em pectina, apresenta características de hidratação, troca iônica e propriedades reológicas peculiares. Estas propriedades estão intimamente relacionadas à estrutura química, mas a estrutura física (área de superfície, tamanho das partículas, tamanho dos poros) do material da planta rica em pectina também deve ser considerada (Thibault & Ralet, 2001; Voragen *et al.*, 2001).

Durante o amadurecimento, a colheita e a estocagem de frutas e vegetais, as mudanças na quantidade e na natureza das pectinas presentes determinam os atributos de qualidade em frutas e vegetais frescos (textura, maturação), características de processamento dos alimentos manufaturados (filtração, clarificação, tratamento térmico etc), e a biodisponibilidade de importantes matérias-primas constituintes da planta, como açúcares, óleos, proteínas, corantes, antioxidantes, e vitaminas (Voragen *et al.*, 2001).

A principal fonte para a extração de pectina é o albedo de frutas cítricas, utilizado como ingrediente natural pela indústria de alimentos, devido à sua capacidade de formar gel em baixas concentrações, como em geléias e marmeladas, e de aumentar a viscosidade de bebidas. As pectinas são também bastante empregadas como estabilizantes em produtos lácteos e em produtos com baixo teor de gordura (Voragen *et al.*, 2001).

As pectinas diferem entre si conforme o seu conteúdo de ácido galacturônico e de açúcares neutros, a composição das ligações glicosídicas, o grau de metil-esterificação e de acetilação, o teor de amido e o peso molecular. Esses parâmetros podem influenciar a estabilidade em função do pH, da temperatura, e de outros fatores da matriz, como a formação de estruturas supramoleculares e a degradação enzimática. Uma pectina altamente metil-esterificada é muito instável em sistemas onde o pH seja maior que 5, situação em que pode vir a despolimerizar-se rapidamente, quando o sistema sofrer aquecimento. A remoção dos grupos metil-éster e acetila pode também ocorrer em pHs neutros (Voragen *et al.*, 2001).

As pectinas também podem ser degradadas e modificadas pela ação de diversas enzimas, presentes em plantas, e também são produzidas por diversos microrganismos (Voragen *et al.*, 2001). As duas enzimas mais importantes, envolvidas na degradação da pectina, são a pectinesterase e a poligalacturonase (Laats *et al.*, 1997).

Estrutura química da pectina

As substâncias pécticas são, provavelmente, a classe mais complexa de polissacarídeos presentes na parede celular das plantas. Essencialmente, compreendem duas famílias de polímeros acidificados, interligados covalentemente (Voragen *et al.*, 2001), como segue:

1 – Cadeia principal: *Galacturanas*, que são segmentos da pectina que possuem, exclusivamente, resíduos de ácido-D-galacturônico unidos em ligações α -1,4 na cadeia principal, tais como a homogalacturonana e seus substitutos, a xilogalacturonana e a ramnogalacturonana tipo II (RG-II) (Figura 3), que possui uma cadeia de galaturonana altamente ramificada, com partes da cadeia contendo (raros) açúcares, tais como a apiose, a raminose e o KDO (ácido 3-deoxi-D-mano-octulosônico) (Voragen *et al.*, 2001).

2 – Ramificações: Ramnogalaturonanas tipo I, alternando na cadeia principal L-ramnosil ligados em α -1,2 e ácido galacturônico ligados em α -1,4, ramificados com diferentes tipos de oligo- e polissacarídeos neutros, tais como D-galactose, L-arabinose e D-xilose (Figura 3) (Voragem *et al.*, 1995; Voragen *et al.*, 2001).

Figura 3 – Estrutura sistemática da molécula de pectina (Voragen *et al.*, 1995).

1.4 – Enzimas pectinolíticas

Devido à complexidade do substrato, entende-se a multifuncionalidade das diferentes enzimas pectinolíticas. Elas estão presentes em diversas plantas e também são produzidas por uma série de microrganismos. Enzimas pecticas endógenas podem provocar importantes alterações de textura e mudanças no conteúdo, na estrutura química, na solubilidade e em outras propriedades físicas, em frutos e vegetais durante o amadurecimento, estocagem e processamento, como resultado da despolimerização, da desesterificação, e da solubilização (Pilnik & Voragen, 1991, Voragen, *et al.*, 2001).

As enzimas pectinolíticas são classificadas segundo o seu modo de ação no substrato. Podem ser subdivididas em dois grandes grupos: de degradação das homogalacturonanas e de degradação das ramnogalacturonanas (Figura 4) (Voragen *et al.*, 2001).

Figura 4 – Fragmento de galacturana da pectina e pontos de ataque de enzimas pecticas (Voragen *et al.*, 2001).

Enzimas de degradação das homogalacturonanas

a) Pectinesterase

Também denominada de pectina-metil-esterase, pectase, pectina-metil-hidrolase, pectina-metoxilase, pectina-desmetoxilase e pectolipase, a pectinesterase (pectina pectilhidrolase, EC 3.1.11.1, PE) hidrolisa a ligação metil-éster do ácido poligalacturônico da pectina para formar produtos como o ácido péctico e o metanol, e converter pectinas com alto grau de metoxilas em pectinas com baixo grau de metoxilação (Figura 5) e que podem ser hidrolisadas, em seguida, a pectato, pela poligalacturonase (Jiang *et al.*, 2003). A PE ocorre na maioria das plantas e também é produzida por uma série de fungos e bactérias. As PE de plantas apresentam um pH ótimo em torno de 7,0 e atuam na cadeia de galacturonana para criar blocos de grupos carboxílicos livres. A hidrólise da pectina a ácidos pécticos, na presença de íons divalentes, como o Ca^{+2} , induz um enrijecimento do tecido devido à formação de pontes entre o Ca^{+2} e os grupos carboxílicos do ácido péctico (Whitaker, 1996; Voragen *et al.*, 2001).

Durante o amadurecimento de frutos e vegetais, a PE remove os grupos metílicos, constituintes da pectina na parede celular, os quais são, então, despolimerizados pelas poligalacturonases, diminuindo assim a adesão intracelular e a rigidez dos tecidos (Alonso *et al.*, 1995; Assis *et al.*, 2001). Essa redução no grau de metoxilação está diretamente relacionada à textura e à firmeza de frutas e vegetais, uma vez que ocorre um aumento na hidratação na parte da molécula desmetoxilada, o que gera calor e diminui a susceptibilidade para a β -degradação da pectina, aumentando as forças de repulsão entre os biopolímeros da matriz da parede celular (Tijssens *et al.*, 1997). Dessa forma, a PE nativa pode ser utilizada para proteger e melhorar a firmeza de diversas frutas e vegetais durante o processamento, bem como nas etapas de extração e de clarificação de sucos de frutas (Fayyaz *et al.*, 1993). As PE são os principais agentes responsáveis pela clarificação de sucos de frutas e, por isso, o controle de sua atividade é muito importante na atividade de preservação do turvor de sucos cítricos. Neste caso, os ácidos pécticos, produzidos pela ação da PE, podem reagir com os íons cálcio, presentes no meio, e formar complexos de pectato de cálcio insolúveis induzindo a perda de turvor em sucos cítricos (Assis *et al.*, 2001). Na prevenção deste defeito de

natureza qualitativa, a enzima deve ser inativada por pasteurização a 90° C por 1min (Versteeg *et al.*, 1980; Seymour *et al.*, 1991). Industrialmente, a PE é utilizada na transformação de pectinas com alto grau de metoxilação em pectinas de baixo grau de metoxilas, mediante a desesterificação do substrato (Benen *et al.*, 2003).

Figura 5 – Hidrólise da ligação metil-éster do ácido poligalacturônico da pectina, responsável pela formação do ácido péctico e metanol, devido à ação da pectinesterase (Whitaker, 1996).

Da ação da PE resulta a liberação de metanol e, conseqüentemente, a formação de grupos carboxílicos – que podem englobar duas formas específicas de monitoramento da atividade enzimática. A liberação de H^+ pode ser monitorada por meio de um sistema não-tamponado, mediante a adoção de um indicador de pH que corresponda ao pH ótimo de atividade PE. A liberação de metanol pode também ser medida pela cromatografia líquida-gasosa ou pela utilização de métodos colorimétricos, onde o metanol é oxidado a formaldeído (Schols & Voragem, 2003).

b) Poligalacturonases

As poligalacturonases, ou pectinases (poli- α -1,4-galacturonide glicano-hidrolase, EC 3.2.1.15 e 3.2.1.67, PG), rompem as ligações glicosídicas α -1,4 do ácido galacturônico próximas ao grupo carboxílico livre por hidrólise (Figura 6). Hidrolisam pectinas com baixo teor de metoxilas ou de ácidos pécticos, preferencialmente, uma vez que essas enzimas podem apenas romper as ligações glicosídicas adjacentes ao grupo carboxílico livre (Voragen *et al.*, 1995). Podem ser subdivididas em enzimas que degradam o substrato na forma *endo* (endo-poligalacturonase, EC 3.2.1.15), as quais quebram a cadeia de pectina de maneira aleatória no interior da cadeia, e no modo *exo* (exo-poligalacturonase, EC 3.2.1.67),

quando quebram os ácidos mono e digalacturônicos a partir da extremidade não redutora da cadeia. As endopoligalacturonases, com sua forte ação despolimerizante, são de importância tecnológica particular, dado que o monitoramento de sua atividade pode influenciar a firmeza de tomates. Para PGs, pectatos e pectinas com baixo teor de metoxilação são o substrato preferido, pois essas enzimas têm atividade muito baixa em pectinas com alto teor de metoxilas. A enzima é produzida por plantas e por microrganismos e apresenta um pH ótimo de atividade enzimática entre 4 e 5 (Pilnik & Voragen, 1991; Whitaker, 1996; Voragen *et al.*, 2001; El-Zoghbi, 2003).

Na parede celular de plantas, a PG pode atacar e solubilizar a pectina nativa (protopectina) com alto grau de esterificação, dependendo da distribuição dos grupos carboxílicos na molécula devido à ação da PE. Conforme seja o tipo de hidrólise, as PEs são consideradas como participativas do amolecimento dos tecidos de plantas durante o amadurecimento (Labib *et al.*, 1995).

Figura 6 – Quebra da ligação glicosídica da pectina por hidrólise devido à ação de poligalacturonase (Fonte: Whitaker, 1996).

A atividade poligalacturonásica pode ser quantificada por meio: a) da diminuição da viscosidade na mistura de reação; b) da formação de grupos redutores; c) da diminuição da rotação óptica ou d) da redução da formação de precipitados na presença de íons Ca^{2+} ou de solventes apolares. Somente a formação de grupos redutores e a medida da diminuição da rotação óptica estão diretamente correlacionadas ao número de ligações glicosídicas hidrolisadas. Para se distinguir as *endo* das *exo* poligalacturonases, ambos os testes são necessários (Whitaker, 1994).

c) *Pectato liase*

As pectato-liases (poli- α -1,4,-D-galacturonide-liase, EC 4.2.2.2. e 4.2.2.9, PAL) quebram as ligações glicosídicas adjacentes ao grupo carboxílico livre da pectina e dos ácidos pécticos, não por hidrólise, mas pelo mecanismo de β -eliminação (Figura 7). O rompimento da ligação glicosídica forma dois grupos: um galacturomil redutor e outro reduzido. Este último grupo de enzimas também contém as formas endo- e exo-enzimas. A forma *endo* (EC 4.2.2.2.) quebra a cadeia de pectina de maneira aleatória, enquanto as *exo*-PALs (EC 4.2.2.9) quebram os dímeros insaturados a partir da extremidade não-redutora da cadeia. Os substratos preferidos para as atividades endo-pectato-liases são pectinas com baixo teor de metoxilas, pois tais enzimas toleram uma série de resíduos de ácido galacturônico metil-esterificado em seu sítio ativo (Whitaker, 1996).

Figura 7 – Quebra da ligação glicosídica da pectina por β -eliminação devido à ação de pectato-liase (Fonte: Whitaker, 1996).

Até pouco tempo, era sabido que a pectato liase era uma enzima secretada por uma série de fungos e bactérias patogênicos em plantas, tendo como ação resultante a maceração do tecido. Entretanto, um grande número de seqüências similares à pectato liase, observadas em genomas de plantas sugerem um importante papel desta enzima nos vários processos de desenvolvimento do vegetal (Marín-Rodríguez *et al.*, 2002). O primeiro seqüenciamento foi determinado por Wing *et al.* (1989), citado por Marín-Rodríguez *et al.* (2002), a partir do pólen de plantas. Dois genes com seqüências similares a pectato liases de *Erwinia* foram expressos em nível máximo em flores, anteras e pólen de tomates maduros (Kulikauskas & McCormick, 1997, citado por Marín-Rodríguez *et al.*, 2002). O seqüenciamento de pectato liases já foi reportado em plantas superiores, como morango (Jiménez-

Bermúdez *et al.*, 2002), banana (Nakaniwa *et al.*, 2004; Payasi & Sanwal, 2003) e uva (Nunan *et al.*, 2001).

O pH ótimo para a atividade da enzima varia entre 8,5 e 9,5, enquanto para a maioria das PGs é entre 5,0 e 6,5. A necessidade do íon Ca^{2+} para a sua estabilização é uma característica da PL, ao contrário da PG. Outros cátions divalentes, como o Sr^{2+} , Mn^{2+} e o Mg^{2+} , também estimulam a atividade enzimática, mas não do mesmo modo que o Ca^{2+} (Di Pietro & Roncero, 1996).

Alguns microrganismos produzem somente PL, enquanto outros produzem tanto a PL quanto a PG. É fácil distinguir as duas enzimas pela correlação do número de grupos redutores formados com o número de duplas ligações formadas, medida espectrofotometricamente. Quando somente a PL está presente, o número de grupos redutores e de dupla ligações formados é exatamente o mesmo, tanto em preparações ou extratos brutos, quanto em purificados. Quando ambas as enzimas estão presentes, o número de grupos redutores formados supera o de duplas ligações (Whitaker, 1994).

Tanto a poligalacturonase quanto a pectato liase formam grupos redutores quando a ligação glicosídica é rompida, o que ocasiona a perda de textura e, conseqüentemente, não podem ser distinguidas através do emprego do mesmo método. Assim, a atividade pectato-liásica pode ser mensurada pelos mesmos métodos citados anteriormente e referidos à poligalacturonase (Whitaker, 1994).

Enzimas de degradação das ramnogalacturonanas

Tais enzimas somente foram descobertas na década passada. Compreendem dois tipos de enzimas despolimerizantes: a hidrolase e a liase. O primeiro tipo rompe a ligação α -ácido-galatopiranosilurônico-(1→2)- α -ramnopiranosil em ramnogalacturonana (RG hidrolase), enquanto o segundo rompe a ligação α -ramnopiranosil-(1→4)- α -ácido-galatopiranosilurônico por trans-eliminação (RG liase). Além destas enzimas, outras duas foram encontradas em fragmentos de ramnogalacturonanas: a ramnogalacturonana ramnohidrolase, que libera grupos ramnosil de sua extremidade não redutora, e a ramnogalacturonana galacturonohidrolase, que libera grupos galacturanosil da extremidade não-redutora da cadeia (Pilnik & Voragen, 1991).

1.5 – Celulose

A parede celular é o principal componente que confere a textura de frutos e vegetais; nos alimentos, a textura é alterada de forma acentuada durante os processos de amadurecimento e/ou cozimento (Chappe & Carpita, 1998).

A celulose é o principal constituinte da parede celular de plantas e ocorre, normalmente, em conjunto com outros componentes, como as hemiceluloses, a pectina, e a lignina. A molécula de celulose consiste em resíduos de β -D-glucopiranosil, unidos por meio de ligações glicosídicas β -1,4 (Figura 8). Devido à sua linearidade e natureza regular, as moléculas de celulose se associam e formam feixes fibrosos. As regiões cristalinas são ligadas por pontes de hidrogênio intermoleculares (Bemilher & Whistler, 1996).

De acordo com sua origem, a molécula de celulose apresenta diferentes graus de polimerização, que variam de 1.000 a 14.000, o que corresponde a pesos moleculares que vão de 162 a 2.268 kDa. Em função do alto peso molecular de sua estrutura cristalina, a molécula de celulose é insolúvel em água. Entretanto, a celulose purificada pode ser convertida em um polímero solúvel em água (mediante o processo de substituição), e é bastante utilizada como ingrediente alimentício. Esse polímero solúvel é conhecido comercialmente como carboximetilcelulose (CMC) (Belitz & Grosch, 1999).

A celulose microcristalina é muito utilizada como ingrediente em produtos alimentícios de baixa caloria, como molhos para saladas e em sobremesas e sorvetes. Sua capacidade de dispersão e hidratação aumenta substancialmente pela adição de pequenas quantidades de carboximetilcelulose. A celulose pode ser alcalinizada, formando assim uma série de derivados com propriedades de intumescimento interessantes e que se refletem no aumento da solubilidade, como a carboximetilcelulose, produzida por meio do tratamento da celulose com soluções de hidróxido de sódio a 18% (Belitz & Grosch, 1999).

Sometimes shown as

Figura 8 – Molécula de celulose. Fonte: Fibersource, 2004.

1.6 – Celulases

As celulases hidrolisam as ligações glicosídicas β -1,4 na molécula de celulose. São subdivididas em quatro classes, baseadas na posição da hidrólise e no produto formado. As endoglucanases (endo-1,4[1,3;1,4]- β -glucan 4-glucanohidrolases, EC 3.2.1.4) hidrolisam as ligações internas da cadeia de celulose. As exocelobiohidrolases (1,4- β -D-glucan celobiohidrolases, EC 3.2.1.91) liberam, predominantemente, a celobiose da molécula de celulose. As exoglucohidrolases (1,4- β -D-glucan glucobiohidrolases, EC 3.2.1.74) liberam, predominantemente, a glicose, a partir da extremidade não-redutora da molécula de celulose. Por fim, a quarta classe de celulases é a β -glicosidase (β -glicosidase glicohidrolase, EC 3.2.1.21), que hidrolisa celobiose e celotriose, produzindo glicose. Tecnicamente, este último grupo não é considerado celulase, uma vez que as enzimas não hidrolisam celulose. No entanto, estão inclusos neste grupo, pois hidrolisam a ligação glicosídica β -1,4 e sua forma de ação é importante para a hidrólise da celulose à glicose (Johnston, 2003). O amolecimento de frutas e vegetais é atribuído não só à degradação de substâncias pécticas pelas enzimas

pectinolíticas, mas também às alterações ocorridas na cadeia de celulose no período pós-colheita (Hilton & Pressey, 1979).

A análise da atividade celulásica apresenta problemas singulares, em geral não observados nos estudos de outros tipos de enzimas. A celulose, substrato nativo para a celulase, é insolúvel e varia significativamente em sua estrutura (Johnston, 2003). O uso de substratos sintéticos, como a carboximetilcelulose (CMC), derivada da celulose através de reação com álcali e ácido cloroacético, é solúvel em água e apresenta cadeia molecular mais curta. A estrutura da CMC é baseada em polímeros de β -(1-4)-D-glucopiranoses. Este substrato é mais adequado que a celulose para a medição de atividade, devido a heterogeneidade do sistema. A ação da celulase sobre a CMC pode ser medida através da redução da viscosidade do sistema ou por meio da determinação da taxa de formação de grupos redutores (Whitaker, 1994).

1.7 – Tempo de armazenamento de frutos e vegetais

Vários são os fatores que podem acelerar a deterioração dos produtos de origem vegetal, normalmente associados às respostas fisiológicas dos tecidos às condições adversas do meio. Os processos fisiológicos, principalmente a respiração e a transpiração, além das perdas patológicas provocadas pelo ataque de microrganismos, aceleram a senescência dos produtos. Todo o esforço voltado à conservação deve ter por objetivo reduzir a taxa de ocorrência desses processos, particularmente o que se refere à respiração, pois embora seja vital à manutenção da vida, deve ser mantida em nível reduzido para que se retarde ao máximo a senescência dos órgãos vegetais já mencionados (Avelar-Filho, 1989).

A respiração é um processo de obtenção de oxigênio e de oxidação das substâncias orgânicas celulares ricas em energia, como o amido, açúcares, e os ácidos orgânicos, voltado à produção de CO_2 , H_2O e da própria energia. A transpiração é um processo de perda de água. Antes da colheita, quando o vegetal ainda está preso à planta parental, as perdas que resultam da respiração e da transpiração são supridas pela água, pela fotossíntese, e pelos minerais da planta. Após a colheita, as perdas devidas à respiração e à umidade não são compensadas e o processo deteriorativo se inicia. As mudanças fisiológicas da respiração, transpiração e biossíntese, são afetadas por fatores intrínsecos (frutos climatéricos

versus frutos não-climatéricos e produção de substâncias como etileno e CO₂) e extrínsecos (como temperatura), mas em geral provocam o declínio na qualidade e na vida-de-prateleira de frutos e vegetais (Floros, 1993).

Além da deterioração fisiológica, outros tipos de degradação podem ocorrer em frutos e vegetais. As alterações químicas e enzimáticas podem provocar mudanças no amolecimento do tecido, perdas de cor, odor, sabor e pigmentos, bem como alterações de natureza nutricional. Os danos mecânicos também produzem efeitos similares, provenientes da colheita, manuseio, processamento e embalagem. A contaminação microbiana também contribui significativamente para o declínio da qualidade, com implicações na segurança sanitária do produto. O aumento da população microbiana depende de condições de crescimento, do nível populacional inicial, manuseio, processamento, e condições de embalagem e de armazenamento. Finalmente, frutas e vegetais também podem sofrer o ataque de organismos, como pestes e insetos, promovendo mudanças deteriorativas e declínio na qualidade dos produtos (Floros, 1993).

O tempo de armazenamento de frutos e vegetais pode ser prolongada pelo retardamento ou pela completa inativação de alguns processos fisiológicos e deteriorativos. O cuidado no manuseio pós-colheita e o uso de técnicas como baixas temperaturas de estocagem, atmosfera controlada e processamento mínimo, apenas retardam a ação negativa das atividades fisiológicas. Processos de preservação tradicionais, tais como a esterilização a quente, a desidratação ou o congelamento, reduzem dramaticamente, ou por completo a degradação fisiológica, microbiológica e enzimática, prolongando consideravelmente o tempo de estocagem. No entanto, o processamento tradicional é geralmente acompanhado de perdas na qualidade do produto, tais como alterações nutricionais, alteração de textura, etc (Avelar-Filho, 1989).

O principal desafio na comercialização de frutos e vegetais é fornecer produtos de qualidade uniforme ao longo do ano. Por isso, é de suma importância a escolha do tipo de processamento, aliada a técnicas de manuseio adequadas e à embalagem apropriada.

Em frutas e vegetais frescos, as técnicas de preservação incluem refrigeração, uso de embalagem com atmosfera modificada, e controle de umidade. As duas primeiras técnicas citadas fazem parte do estudo de preservação da mandioquinha, objeto deste trabalho. Segundo a literatura, estes processos

apresentam um prolongamento curto da vida-de-prateleira, uma vez que o objetivo é proteger o estado natural/fresco do produto. Para prolongar o período de armazenamento, o processamento se faz necessário.

A taxa de respiração e transpiração de frutas e vegetais frescos é um bom indicador de vida-de-prateleira: quanto maior a taxa, menor o tempo de armazenamento. Considerando que os métodos de preservação curta têm como objetivo manter o material fresco, o método mais indicado para aumentar a vida-de-prateleira é o da redução das taxas de transpiração e respiração. Neste caso, o efeito da diminuição da temperatura não somente minora estas taxas, como atua na redução de reações biológicas e bioquímicas, incluindo o crescimento microbiano (Floros, 1993).

O uso de atmosfera modificada visa a retardar os processos fisiológicos (como a respiração, o amadurecimento, e a deterioração) e a minimizar as injúrias mecânicas e o crescimento microbiano. Combinado com o processo de refrigeração, ela aumenta consideravelmente o período de conservação. Segundo a literatura, raízes tuberosas são mais bem preservadas na ausência de oxigênio e de gás carbônico, sugerindo que o uso de embalagem a vácuo pode ser uma solução opcional para a preservação deste grupo de vegetais (Floros, 1993).

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais

Verificar as alterações na atividade de enzimas amilolíticas, pectinolíticas e celulásicas em raízes de mandioquinha-salsa após a colheita, armazenadas sob diferentes condições de temperatura e acondicionamento, visando a identificar os mecanismos de deterioração das raízes.

Objetivos específicos

- 1) Estudar as melhores condições de extração de pectinametilesterase e de poligalacturonase das raízes de mandioquinha, mediante o emprego da ferramenta estatística, a *metodologia de superfície de resposta* (MSR);
- 2) Verificar a atividade das enzimas amilolíticas, pectinolíticas e celulásicas das raízes de mandioquinha-salsa, bem como determinar os teores de açúcares redutores, de amido total e de proteínas, durante o período de estocagem, sob diferentes condições de armazenamento;
- 3) Verificar as alterações de firmeza e perda de água das raízes, em decorrência do armazenamento;
- 4) Estudar a morfologia do grânulo de amido e sua degradação em diferentes estágios do armazenamento das raízes tuberosas através da técnica de microscopia eletrônica de varredura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – MATERIAIS

Material vegetal

As raízes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Cv. *Amarela Comum*), fornecidas pelo CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo) um dia pós-colheita, provenientes da região do Paraná, foram armazenadas em diferentes condições:

- 1) temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), sem embalagem (Grupo 1);
- 2) temperatura ambiente e embalagem a vácuo (Grupo 2);
- 3) temperatura ambiente, lavagem das raízes com hipoclorito a uma concentração de 200 ppm e embalagem a vácuo (Grupo 3);
- 4) temperatura de refrigeração ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$), sem embalagem (Grupo 4);
- 5) temperatura de refrigeração ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e embalagem a vácuo (Grupo 5);
- 6) temperatura de refrigeração, lavagem das raízes com hipoclorito a 200 ppm e embalagem a vácuo (Grupo 6);

As amostras foram embaladas pelo próprio fornecedor das raízes, em filmes de nylon-polietileno com face metalizada (Gabilina®) e com uma pressão de vácuo de 70 mmHg. Quatro diferentes lotes de raízes foram estudados:

- 1º Lote: raízes fornecidas pelo CATI (Centro de Distribuição de Sementes e Mudanças de São Bento de Sapucaí), em 15/10/02;
- 2º Lote: raízes fornecidas pelo CEAGESP em 23/05/03;
- 3º Lote: raízes fornecidas pelo CEAGESP em 21/10/03;
- 4º Lote: raízes fornecidas pelo CEAGESP em 15/02/05.

Durante o período de estocagem de onze dias, uma parte das amostras foi coletada periodicamente para a análise de firmeza e energia de penetração e, o restante, armazenado em nitrogênio líquido a -80°C para o posterior preparo dos extratos enzimáticos, determinação de açúcares redutores e medição do teor de proteínas e do amido total.

Reagentes

A álcool oxidase (*P. pastoris*, EC 1.1.3.13), o amido de batata, a 2,4-pentanediona, a pectina cítrica, o ácido galacturônico, o ácido poligalacturônico, o acetato de sódio e a BSA, foram obtidos pela Sigma Chemical Co. St. Louis. A 2-cianoacetamida foi fornecida pela Aldrich Chemical Co. Steinheim. Todos os outros reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico.

3.2 – MÉTODOS

3.2.1 – Pectinesterase e poligalacturonase

Extrato enzimático

As raízes de mandioquinha-salsa foram lavadas, descascadas e cortadas em pequenos cubos ($\pm 2,0$ cm de aresta). Cerca de 200 g de amostra foram homogeneizadas com 200 mL de NaCl, a diferentes concentrações (Tabela 2), em um liquidificador comum, por 2 min. Após a trituração, o pH do homogenato foi ajustado para 4,0, 6,0 ou 8,0, mediante a adição de NaOH 3,0 M ou de ácido acético 2,0 M. O homogenato foi agitado continuamente a 4°C, durante diferentes intervalos de tempo (4, 28 e 52 h). O extrato bruto foi centrifugado a $10.000 \times g$, por 30 min, a 4°C. O sobrenadante, denominado extrato enzimático, foi utilizado diretamente como fonte de enzimas. As extrações em diferentes condições de pH, concentração de NaCl e tempo de agitação, objetivaram definir as melhores condições de extração as enzimas (PE e PG), determinadas por meio da *metodologia de superfície de resposta* (MSR).

Tabela 2 – Condições de extração enzimática para PE e PG em raízes de mandioquinha-salsa: valores codificados e reais^a.

Experimento	Valores codificados			Valores reais		
	X ₁	X ₂	X ₃	NaCl (M)	pH	Tempo de extração (h)
1	-1,0	1,0	1,0	0,5	8,0	52
2	1,0	1,0	1,0	1,5	8,0	52
3	-1,0	-1,0	1,0	0,5	4,0	52
4	1,0	-1,0	1,0	1,5	4,0	52
5	-1,0	1,0	-1,0	0,5	8,0	4
6	1,0	1,0	-1,0	1,5	8,0	4
7	-1,0	-1,0	-1,0	0,5	4,0	4
8	1,0	-1,0	-1,0	1,5	4,0	4
9	0,0	0,0	0,0	1,0	6,0	28
10	0,0	0,0	0,0	1,0	6,0	28
11	0,0	0,0	0,0	1,0	6,0	28
12	-1,0	0,0	0,0	0,5	6,0	28
13	1,0	0,0	0,0	1,5	6,0	28
14	0,0	-1,0	0,0	1,0	4,0	28
15	0,0	1,0	0,0	1,0	8,0	28
16	0,0	0,0	-1,0	1,0	6,0	4
17	0,0	0,0	1,0	1,0	6,0	52

^ax₁ = (NaCl – 1,0)/0,5, onde a concentração de NaCl variou de 0,5 a 1,5 M, x₂ = (pH – 6,0)/2,0, onde o pH variou de 4,0 a 8,0 e x₃ = (t – 28)/24, onde t variou de 4 a 52 h.

Após a determinação do método de extração adequado a cada enzima, o mesmo procedimento foi adotado para a extração enzimática durante os ensaios pós-colheita, nos quais o extrato enzimático foi preparado a cada 2 dias de armazenamento.

Atividade pectinesterásica

A atividade PE foi determinada por meio do método de quantificação de metanol formado (Klavons & Bennett, 1986). Uma alíquota de extrato enzimático (150 μ L) foi adicionado a 100 μ L de uma solução contendo 100 mM de fosfato de sódio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, 0,1 M), pH 6,5, e 0,1% de pectina cítrica. A mistura de reação foi incubada a 25° C, por 15 min. A reação foi interrompida mediante o aquecimento a 100° C em banho de água, durante 3 min. A mistura foi resfriada a 25° C e diluída a 2,0 mL com tampão Tris-HCl, 20 mM, pH 7,5 e 1 U de álcool oxidase foi adicionada. Após 15 min a 25° C, 1,0 mL de 2,4-pentanediona 20mM em fosfato de amônia (2,0 M) foram adicionados e a mistura de reação foi aquecida a 60° C, por 15 min. A absorbância foi medida a $\lambda = 412$ nm contra o branco, preparado com os mesmos componentes da mistura de reação, mas com o extrato enzimático previamente fervido por 5 min, para inativar a enzima. A curva de calibração foi preparada com metanol, em concentrações que variaram de 0 a 435 nmoles de metanol/mL, dado que a relação entre o desenvolvimento de cor e a concentração de metanol são lineares até o valor de 435 nmoles/mL metanol. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi expressa por 1,0 nmoles MeOH x mg proteína⁻¹ x h⁻¹. A pectina utilizada como substrato em todos os experimentos foi exaustivamente dialisada contra água, com o objetivo de diminuir os valores obtidos pelo branco (Castaldo *et al.*, 1989), pois a medida de atividade enzimática se dá em função da quantidade de metanol formado.

Atividade poligalacturonásica

A atividade PG foi medida de acordo com os métodos descritos por Gross (1982) e Honda *et al.* (1982). O método baseia-se na liberação hidrolítica de grupos redutores, a partir do ácido poligalacturônico. Uma solução contendo 5 μ L de extrato enzimático em 45 μ L em tampão acetato de sódio 37,5 mM, pH 4,4, foi incubada com 150 μ L 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, 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 25° C, a quantidade de açúcares redutores formada foi medida a $\lambda =$

276 nm contra o branco, preparado nas mesmas condições, mas com o extrato enzimático fervido previamente, por 5 min. A curva de calibração, usando ácido galacturônico como padrão, foi preparada em concentrações de 0 a 250 nmoles/mL. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi expressa por $1,0 \text{ nmol de ácido galacturônico produzido} \times \text{mg proteína}^{-1} \times \text{h}^{-1}$.

Modelo Experimental e Análise de Dados

O delineamento central composto (DCC) foi utilizado com três variáveis e três replicatas do ponto central, em um total de 17 experimentos. As três variáveis de processo estudadas incluíram a concentração de NaCl (NaCl, M), o valor de pH do tampão de extração (pH), e o tempo de extração (t, h). As condições experimentais do ponto central foram NaCl = 1,0 M, pH = 6,0 e t = 28 h. Os valores experimentais, codificados e reais, estão mostrados na Tabela 2. Os valores em escala foram $x_1 = (\text{NaCl} - 1,0)/0,5$, onde NaCl variou de 0,5 a 1,5 M, $x_2 = (\text{pH} - 6,0)/2,0$, onde o pH variou de 4,0 a 8,0 e $x_3 = (t - 28)/24$, onde t variou de 4 a 52 h e os resultados foram determinados pelo programa STATISTICA. A MSR foi estimada por regressão linear múltipla para os 17 experimentos no delineamento central composto (DCC). A confiança do modelo é calculada com base no valor de R^2 (variação da resposta do modelo).

Otimização do procedimento de extração de PE e PG de raízes de mandioquinha

Os resultados, obtidos a partir dos 17 experimentos descritos anteriormente, foram analisados e o método de extração de ambas as enzimas foi otimizado pela realização de 8 novos experimentos, utilizando a mesma metodologia, sob as seguintes condições: a) para a extração da PG, quatro novos experimentos foram realizados. O pH do homogenato foi ajustado para 3,5, 4,0, 4,5, ou 5,0 pela adição de ácido acético 2,0 M (experimentos I-IV, respectivamente); b) para a extração da PE, quatro novos experimentos foram realizados, ajustando-se o pH do homogenato para 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5, através da adição de NaOH 3,0 M (experimentos V-VIII, respectivamente). A concentração de NaCl e o tempo de extração foram de 1,0 M e 4 h, tanto para a extração de PE, quanto para a PG.

Análise estatística: atividade PE e PG durante o período de armazenamento

O efeito do tratamento das raízes com hipoclorito na atividade enzimática foi avaliado entre os grupos 2 e 3 (raízes armazenadas à temperatura ambiente e embalados a vácuo, não tratadas e tratadas com hipoclorito, respectivamente) em cada um dos três períodos de tempo (1º, 3º e 4º dias pós-colheita) e entre os grupos 5 e 6 (raízes armazenadas à temperatura de refrigeração e embalados a vácuo, não tratadas e tratadas com hipoclorito, respectivamente), em cada um dos seis períodos de armazenamento (1º, 3º, 5º, 7º, 9º e 11º dias pós-colheita), através do teste-T para variáveis independentes ou teste de Mann-Whitney conforme a avaliação prévia da normalidade (teste de Shapiro-Wilk) adotando-se um valor de α de 0,05 para todas as análises.

A interação entre os tratamentos (temperatura e acondicionamento a vácuo) foi avaliada através de ANOVA Fatorial seguida de teste de Tukey HSD para a identificação dos contrastes, no 3º dia pós-colheita, após confirmação da homogeneidade das variâncias pelos testes de Hartley (F-max), Cochran C e Bartlett.

O efeito dos quatro tratamentos (grupos 1, 2, 4 e 5) ao longo do período de stocagem foi avaliado através de ANOVA para medidas repetidas. O software Statistica v.6 (Statsoft Inc., Tulsa, OK) foi utilizado na elaboração dos cálculos e gráficos.

A análise estatística também foi aplicada para verificar o efeito dos tratamentos na atividade dos outros grupos de enzimas (pectato liase, celulase e amilase), bem como na detecção do amido total e análise de energia de penetração, descritos a seguir.

3.2.2 – Extração e detecção de pectato liase

Após a lavagem e remoção da casca, a pectato liase foi extraída das raízes de mandioca 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 $8.100 \times g$, durante 30 min a 4º C, o material decantado foi desprezado e o sobrenadante foi chamado de extrato enzimático.

A atividade enzimática foi determinada segundo o método descrito por Di-Pietro & Roncero (1996). A mistura de reação consistiu na incubação de 20 μ L de extrato enzimático com 1,0 mL de solução contendo 0,2% de ácido poligalacturônico em tampão glicina-NaOH 50 mM, pH 9,5 e 5 mM de CaCl_2 , por 30 min, a 40° C. Os grupos redutores foram quantificados segundo o método de Gross (1982) e Honda *et al.* (1982), pela adição de 200 μ L da mistura com 1,0 mL de uma solução fria de tampão borato, 100 mM, pH 9,0, seguido da adição de 0,2 mL de 2-cianoacetamida 1%. Após 10 min de incubação a 100° C e resfriamento a 25° C, a quantidade de açúcares redutores formada foi medida a $\lambda=276$ nm contra o branco, preparado nas mesmas condições, mas com o extrato enzimático fervido previamente, por 5 min. A curva de calibração, usando ácido galacturônico como padrão, foi preparada em concentrações de 0 a 250 nmoles/mL. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi expressa por 1,0 nmol de ácido galacturônico produzido x g de tecido⁻¹ x h⁻¹.

3.2.3 – Extração e detecção de celulase

A extração da celulase (E.C.3.2.1.4) foi realizada conforme o método de Hilton & Pressey (1974). Após a lavagem e remoção da casca, 5,0 g de mandioca foram homogeneizadas (Ultra Turrax, 1 min) com 5,0 mL de uma solução contendo 12,0 % de polietileno glicol e 0,2 % de bissulfito de sódio, pH 5,0. Após a centrifugação a 10.000 x g por 20 min, a 4° C, o sobrenadante foi descartado e o resíduo foi re-suspendido em 10 mL de água destilada, contendo 0,2 % de bissulfito de sódio. Após novo ciclo de centrifugação e lavagem do decantado, o resíduo foi, então, re-suspendido em 5,0 mL de solução de NaCl (6,0 %), contendo 0,2 % de bissulfito de sódio. O pH do homogenato foi ajustado para 6,0 com NaOH 1,0 M. Após o período de extração de 2 h, a 2° C, e centrifugação (mesmas condições anteriores), o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático.

Para a detecção da atividade celulásica, 200 μ L de extrato enzimático foram incubados com 400 μ L de uma solução com 1,5% de CMC (carboximetilcelulose, m/v), em tampão acetato de sódio 0,04 M, pH 5,0, de acordo com o método de Awad & Young (1979). O branco de reação foi preparado da mesma forma, com o extrato enzimático aquecido em banho de água fervente, por 3 min. As amostras foram incubadas a 30° C, por 17 h e, em seguida, aquecidas em banho em ebulição por

3min para a inativação da enzima. Após o resfriamento e centrifugação a $10.000 \times g$ por 5 min, a glicose livre foi medida segundo o método de Gross (1982) e Honda et al. (1982), já descrito anteriormente – porém, foi utilizada a glicose na determinação da curva padrão. A atividade celulásica (U) foi expressa em μg de glicose liberada em 17 h de incubação a $30^\circ C$, por g de tecido.

3.2.4 – Extração e detecção de enzimas amilolíticas

O extrato amilásico de mandioquinha foi preparado de acordo com o protocolo de Pires (2002), com algumas modificações. Após a lavagem e remoção da casca, as raízes foram cortadas em cubos de, aproximadamente, 2,0 cm de aresta. As amostras foram homogeneizadas em liquidificador comum, com tampão fosfato 0,2M (2,5:1, m/v), pH 6,0, por 2 min. Após a trituração, o homogenato foi filtrado e centrifugado duas vezes, para a total remoção do material decantado entre cada uma das centrifugações, a $10.000 \times g$, por 30 min, a $4^\circ C$. O sobrenadante foi chamado de extrato enzimático.

A atividade amilolítica total foi determinada por meio da medida do complexo amido-iodo, descrita por Street (1974). 200 μL de solução 0,1% de amido de batata foram incubados com 500 μL de tampão fosfato (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4), pH 6,0, foram incubados com 100 μL de uma solução contendo extrato enzimático e NaCl 0,1 M (1:1, m/v), a $50^\circ C$. Após 15 min, a reação foi interrompida pela adição de 400 μL de solução de iodo (I_2 , 10 mM; KI, 14 mM). O volume de reação foi completado com água destilada até 10 mL e a absorbância foi medida a $\lambda = 578$ nm contra branco, onde o extrato enzimático não foi adicionado. A atividade amilolítica (U) foi definida como a quantidade de amido (expressa em nanogramas), hidrolisada por minuto, por miligrama de proteína presente no extrato enzimático.

3.2.5 – Determinação do teor de proteínas

As proteínas presentes nos extratos enzimáticos foram quantificadas pelo método descrito por Bradford (1976), a $\lambda = 595$ nm, utilizando a albumina sérica bovina como padrão. A quantificação foi realizada nos extratos amilásicos, PE e PG.

3.2.6 – Determinação do teor de amido total

Para a determinação do teor de amido total foi utilizado o método descrito por Arêas & Lajolo (1981), com algumas alterações. 500 mg de tecido foram homogeneizados em Ultra Turrax com 5,0 mL de solução de NaOH 0,5 M. Após a neutralização com 5,0 mL de ácido acético 0,5 M, o volume foi completado com água destilada para 100 mL, em um balão volumétrico. Aliquotas de 2,0 mL desta solução foram transferidas para tubos de centrifuga e 8,0 mL de etanol puro foram adicionados. Após a centrifugação a $10.000 \times g$, por 15 min, foi feita uma lavagem com etanol 80%. Após um novo processo de centrifugação, seguido de lavagem com etanol, o precipitado foi, então, hidrolisado, através da incubação com uma solução de 2,0 mL, contendo amiloglicosidase e α -amilase pancreática (14,0 e 0,4 U/mL, respectivamente, Sigma) em tampão acetato, 0,2 M, pH 4,8. Após 2 h de incubação a 37°C , a reação foi interrompida pela adição de 200 μL de ácido perclórico 0,6 M. A glicose formada foi determinada conforme o método da Antrona, descrito por Viles & Silverman (1949), utilizando glicose como padrão. O método consiste na incubação de 200 μL da solução em 1 mL de solução de antrona (0,1 % antrona em ácido sulfúrico 76 %). Após o aquecimento a 100°C , por 10 min, a concentração de glicose formada foi medida pela leitura de absorbância, a $\lambda = 620$ nm. O teor de amido foi calculado através da quantidade de glicose determinada $\times 0.9$.

3.2.7 – Determinação do teor de açúcares redutores

O teor de açúcares redutores foi medido diretamente do extrato amilásico, de acordo com o método descrito por Bernfeld (1955), utilizando glicose como padrão de açúcar redutor.

3.2.8 – Alterações de textura: firmeza e energia de penetração

Durante o período de armazenamento, três raízes de mandioquinha, escolhidas ao acaso, foram utilizadas para a determinação da firmeza, medida por meio do texturômetro SMS (modelo TAXT2i, Stable Micro System, England), equipado com o probe P/2N (formato agulha). As raízes tuberosas foram cortadas transversalmente em forma de discos, com 1,0 cm de espessura, na parte central. A firmeza foi medida em duas partes do disco: na região do xilema e no floema (ver Figura 9). Os seguintes parâmetros de ensaio foram utilizados nos testes de firmeza: velocidade pré-teste: 2,0 mm/s, velocidade do teste: 1,0 mm/s, velocidade pós-teste: 5,0 mm/s, distância de ruptura: 4,0 mm. Cada determinação foi realizada, pelo menos, seis vezes.

A energia de penetração (J) será 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.

Figura 9 – Ilustração da morfologia da planta de mandioquinha-salsa. A região do xilema é a região interna do coração (cilindro vascular), enquanto a do floema é a região do parênquima da raiz tuberosa. Fonte: CEASA MINAS, 2004.

3.2.9 – Perda de peso das raízes durante o período de armazenamento

A perda de peso (água) foi expressa como uma porcentagem do peso fresco das raízes tuberosas em relação ao seu peso inicial pós-colheita, para as raízes não embaladas a vácuo. O peso de 8 raízes armazenadas em estufa (25°C) e sob temperatura de refrigeração (4° C) foi verificado a cada 2 dias, durante um intervalo de tempo de 11 dias ou até a deterioração total das raízes, usando uma balança eletrônica (Shimadzu BL-2200H).

3.2.10 – Extração do amido de mandioca em diferentes estágios de armazenamento e observação em microscópio eletrônico de varredura

O amido de mandioca foi extraído segundo o protocolo descrito no Capítulo 3 (item 3.2.1 – Extração do amido de mandioca). O amido foi extraído nos seguintes estágios: 1) 1º dia pós-colheita; 2) 9º dia pós-colheita, raízes armazenadas à temperatura ambiente e 3) 9º dia pós-colheita, raízes armazenadas à temperatura de refrigeração.

Para a realização da microscopia eletrônica de varredura dos amidos extraídos, as amostras foram preparadas da seguinte maneira: sobre o porta-amostras (“stub”) do microscópio, colou-se uma fita dupla-face em forma de discos ($\phi \cong 50\text{mm}$), cujas bordas foram “pintadas” com tinta condutora de prata. Os amidos de mandioca foram dispersos sobre os discos e, posteriormente, metalizados com ouro pelo processo de “sputtering”, através da utilização do metalizador Edwards Sputter Coater 150B. Após a metalização, as amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura modelo Jeol JSM 840^a.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Pectinesterase e poligalacturonase: otimização do processo de extração

Os procedimentos de extração de PE e PG basearam-se no estudo de diferentes valores de pH, tempo de extração e concentração de NaCl, citados na literatura, para diferentes fontes de frutos e vegetais (Tabelas 3 e 4). Como as condições de extração variam muito entre os alimentos estudados, e nenhum estudo havia sido realizado anteriormente, com a finalidade de extrair e caracterizar a atividade destas enzimas em raízes de mandioquinha, a otimização do procedimento de extração, através da MSR, foi bastante útil e necessária.

Tabela 3 – Condições de extração de PE de diferentes frutas e vegetais, citados na literatura.

Material	NaCl (M)	pH	Tempo de Extração (h)
Acerola (Assis et al., 2002)	0,60	8,3	1
Banana (Ly-Nguyen et al., 2002a, 2002 b)	1,00	8,0	24
Batata (Tijsskens et al., 1997)	1,00	*	1
Batata (Puri et al., 1982)	1,00	8,0	24
Cenoura (Ly-Nguyen et al., 2002a, 2002 b)	1,00	8,0	0,25
Cenoura (Alonso et al., 2003)	1,00	6,0	3
Cenoura (Tijsskens et al., 1997)	1,00	*	1
Cereja (Alonso et al., 1995)	1,00	6,0	1
Ervilha (Laats et al., 1997)	1,00	7,8	2
Goiaba (Abu-Goukh & Bashir, 2003)	1,00	8,2	24
Grapefruit (Seymour et al., 1991)	0,30	8,0	24
Graviola (Arbaisah et al., 1996)	1,92	8,4	0,02
Kiwi (Wegrzyn & Macrae, 1992)	-	5,5	1
Laranja (Hou, 1997)	1,00	4,1	1
Laranja (Kömer, Zimmermann & Berk, 1980)	0,25	7,0	2
Maçã (Castaldo et al., 1989)	-	8,2	24
Manga (Labib et al., 1995)	1,00	6,5	18
Papaya (Jiang et al., 2003)	1,00	*	0,03
Papaya (D'Innocenzo & Lajolo, 2001)	1,00	5,5	1
Papaya (Fayyaz et al., 1993)	2,00	8,0	5
Pêssego (Javeri & Wicker, 1991)	0,10	7,5	1
Sapote mamey (Ocampo et al., 2003)	1,50	7,5	0
Tomate (Pressey & Woods, 1992)	0,20	3,0	0,25

* O pH de extração não foi citado no artigo.

Tabela 4 – Condições de extração de PG de diferentes frutas e vegetais, citados na literatura.

Material	NaCl (M)	pH	Tempo de extração (h)
Banana (Pathak et al., 2000)	0-1,00	7,0	a
Goiaba (Abu-Goukh & Bashir, 2003)	1,00	8,2	24
Kiwi (Wegrzyn & Macrae, 1992)	1,25	6,5	0,75
Manga (Labib et al., 1997)	1,00	6,5	18
Morango (Nogata et al., 1993)	1,00	6,0	12
Papaya (Jiang et al., 2003)	1,00	b	0,03
Papaya (D’Innocenzo & Lajolo, 2001)	1,00	5,5	1
Sapote mamey (Ocampo et al., 2003)	1,00	7,0	3
Tomate (Ma & Barrie, 2001)	1,20	3,0	0,5
Tomate (Yoshida et al., 1984)	0,86	9,0	2

^aO tempo de extração não foi citado no artigo.

^bO pH de extração não foi citado no artigo.

Extração e detecção de atividade pectinesterásica (PE)

Os resultados dos 17 experimentos são mostrados na Tabelas 5, 6 e 7 e na Figura 10. O modelo matemático foi expresso em variáveis codificadas e calculado através do software Statistica:

$$y_{\text{calc}} (\text{Atividade PE (U)}) = 1,65 + 0,07x_1 + 3,84x_2 + 1,07x_3 - 2,04x_1x_1 + 5,45 x_2x_2 - 2,04x_3x_3 + 0,09x_1x_2 - 1,50 x_1x_3 + 1,34 x_2x_3$$

O pH (x_2) e o termo quadrático do pH (x_2x_2), influenciaram significativamente a extração de PE de mandioquinha (Tabelas 6 e 7, $p < 0,05$). A Figura 10 representa o MSR para a atividade PE, como função da concentração de NaCl e do tempo de extração, a pH 4,0 (a), 6,0 (b) e 8,0 (c).

Tabela 5 – Atividade PE e PG dos extratos de mandioquinha-salsa.

Experimento	Valores reais			Atividade enzimática	
	NaCl (M)	pH	Tempo (h)	Atividade	Atividade
				PE (U)	PG (U)
1	0,5	8,0	52	11,35	0
2	1,5	8,0	52	5,69	0
3	0,5	4,0	52	0	37,79
4	1,5	4,0	52	0	16,52
5	0,5	8,0	4	0	0
6	1,5	8,0	4	6,36	0
7	0,5	4,0	4	0	20,45
8	1,5	4,0	4	0	17,39
9	1,0	6,0	28	1,02	0
10	1,0	6,0	28	1,10	0
11	1,0	6,0	28	1,26	0
12	0,5	6,0	28	0	3,09
13	1,5	6,0	28	0	0
14	1,0	4,0	28	0	12,45
15	1,0	8,0	28	14,97	6,78
16	1,0	6,0	4	0	1,99
17	1,0	6,0	52	0	17,38
I	1,0	3,5	4	-	6,20
II	1,0	4,0	4	-	67,66
III	1,0	4,5	4	-	48,86
IV	1,0	5,0	4	-	24,53
V	1,0	7,0	4	33,86	-
VI	1,0	7,5	4	39,12	-
VII	1,0	8,0	4	35,08	-
VIII	1,0	8,5	4	23,47	-

Tabela 6 – ANOVA para a atividade PE em função da concentração de NaCl (x_1), do pH (x_2) e do tempo de extração (x_3) de diferentes extratos de raízes tuberosas de mandioca.

Efeitos	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor F	Valor p
x_1	0,0490	1	0,0490	0,00612	0,939821
x_1x_1	11,1100	1	11,1100	1,38820	0,277207
x_2	147,2257	1	147,2257	18,39597	0,003615
x_2x_2	79,5412	1	79,5412	9,93874	0,016094
x_3	11,4062	1	11,4062	1,42522	0,271429
x_3x_3	11,1100	1	11,1100	1,38820	0,277207
x_1x_2	0,0612	1	0,0612	0,00765	0,932738
x_1x_3	18,0600	1	18,0600	2,25662	0,176743
x_2x_3	14,2578	1	14,2578	1,78152	0,223739
Erro	56,0220	7	8,0031	-	-
SQ Total	327,0540	16	-	-	-

Tabela 7 – Efeitos estimados, erro padrão e valor t (distribuição t-Student) dos dados experimentais referentes à atividade PE de raízes de mandioca.

Efeitos	Parâmetros estimados	Erro padrão	Valor t	Valor p
Interação	1,64648	1,210523	1,36014	0,215963
x_1	0,14000	1,789206	0,07825	0,939821
x_1x_1	-4,07268	3,456640	-1,17822	0,277207
x_2	7,67400	1,789206	4,28905	0,003615
x_2x_2	10,89732	3,456640	3,15258	0,016094
x_3	2,13600	1,789206	1,19383	0,271429
x_3x_3	-4,07268	3,456640	-1,17822	0,277207
x_1x_2	0,17500	2,000393	0,08748	0,932738
x_1x_3	-3,00500	2,000393	-1,50220	0,176743
x_2x_3	2,67000	2,000393	1,33474	0,223739

Segundo o modelo, as melhores condições de extração da enzima ocorrem a pH 5,26, por 24 h, a uma concentração de NaCl de 0,97 M. Considerando que os valores máximos de atividade PE ocorreram a pH 8,0 (Tabela 5, experimentos 1 e 15; Figura 10), decidiu-se que a extração da enzima deveria ser feita em pHs

próximos a 8,0 (Tabela 5, experimentos VI a VIII). Após a realização dos ensaios, verificou-se que o maior valor de atividade PE ocorreu em pH 7,5, fazendo-se necessário um novo experimento a pH 7,0 (Tabela 5, experimento V). Os resultados mostraram que o melhor valor de pH para extração PE de mandioquinha é 7,5 (Figura 10). Javeri & Wicker (1991) extraíram PE de pêssego e sapote mamey neste mesmo valor de pH. PE de batata, papaya, banana, cenoura e grapefruit, foram extraídas a pH 8,0 (Tabela 3). Pressey & Woods (1992) extraíram PE de tomates a pH 3,0, o mais baixo valor de pH de extração desta enzima, encontrado na literatura.

Os melhores resultados de atividade enzimática foram observados após 24h de agitação do extrato enzimático. Estes resultados foram encontrados experimentalmente e estimados pelo modelo (MSR). Entretanto, por não ser uma variável significativa ($p=0,27$, Tabelas 6 e 7), determinou-se que o tempo de extração para ensaios posteriores seria de 4 h, considerando-se que, com a redução do tempo de extração para 4 h, tem-se a otimização do método de extração, a redução de riscos de contaminação e proteólise da enzima. Os resultados mostraram que a extração PE, mesmo após 4 h de agitação, superou os resultados observados em outros experimentos, onde o tempo de extração era mais longo (Tabela 5, experimentos V-VIII). Na maioria dos trabalhos que envolvem a extração PE, o extrato enzimático é obtido após 1 ou 2 h de agitação (Tabela 3).

A concentração de NaCl, utilizada para otimizar a extração da enzima, foi de 1,0 M, bastante similar ao valor obtido pelo modelo, de 0,97 M. Muitos trabalhos utilizaram esta mesma concentração de NaCl na extração de PE de outras fontes (Tabela 3).

Arbaisah *et al.* (1996) também utilizaram o MSR na determinação das condições ótimas de extração de PE de graviola (*Annona muricata*). No entanto, somente duas variáveis de processo foram estudadas: a concentração de NaCl (0,5 a 4,0) e o pH do tampão de extração (4,0 a 9,0). O pH ótimo de extração determinado foi de 8,4, enquanto a concentração de NaCl foi de 1,92 M para PE de graviola.

Figura 10 – Modelo de superfície de resposta para atividade PE (U) em função da concentração de NaCl e do pH do tampão de extração, a 28 h de extração. As condições experimentais do ponto central (0,0) foram NaCl = 1,0 M, pH = 6,0 e t = 28 h (ver Tabela 5).

Extração e detecção de atividade poligalacturonásica (PG)

As Tabelas 5, 8 e 9 e Figura 11 mostram os resultados dos 17 experimentos. O modelo matemático, expresso em variáveis codificadas, foi o seguinte:

$$y_{\text{calc}} (\text{Atividade PG (U)}) = 2,10 - 2,74x_1 - 9,78x_2 + 3,19x_3 - 2,13x_1x_1 + 5,94 x_2x_2 \\ + 6,01x_3x_3 + 3,04x_1x_2 - 2,28 x_1x_3 - 2,06 x_2x_3$$

O pH (x_2) da solução influenciou significativamente a extração de PG de mandioquinha (Tabelas 8 e 9, $p < 0,05$). A Figura 11 representa o MSR para a atividade PG como função da concentração de NaCl e do tempo de extração, a pH 4,0 (a), 6,0 (b) e 8,0 (c).

Tabela 8 – ANOVA para a atividade PG em função da concentração de NaCl (x_1), do pH (x_2) e do tempo de extração (x_3) de diferentes extratos de raízes tuberosas de mandioquinha.

Efeitos	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor F	Valor p
x_1	75,186	1	75,186	2,14018	0,186886
x_1x_1	12,189	1	12,189	0,34697	0,574342
x_2	958,875	1	958,875	27,23772	0,001227
x_2x_2	94,439	1	94,439	2,68824	0,145099
x_3	101,506	1	101,506	2,88940	0,132963
x_3x_3	96,679	1	96,679	2,75201	0,141095
x_1x_2	73,994	1	73,994	2,10625	0,189993
x_1x_3	41,451	1	41,451	1,17990	0,313360
x_2x_3	33,908	1	33,908	0,96519	0,358612
Erro	245,914	7	35,1305	-	
SQ Total	1884,438	16	-	-	

Tabela 9 – Efeitos estimados, erro padrão e valor t (distribuição t-Student) dos dados experimentais referentes à atividade PG de raízes de mandioquinha.

Efeitos	Parâmetros estimados	Erro padrão	Valor t	Valor p
Interação	2,1017	2,536207	0,82867	0,434630
x_1	-5,4840	3,748627	-1,46294	0,186886
x_1x_1	-4,2659	7,242125	-0,58904	0,574342
x_2	-19,5640	3,748627	-5,21898	0,001227
x_2x_2	11,8741	7,242125	1,63959	0,145099
x_3	6,3720	3,748627	1,69982	0,132963
x_3x_3	12,0141	7,242125	1,65892	0,141095
x_1x_2	6,0825	4,191093	1,45129	0,189993
x_1x_3	-4,5525	4,191093	-1,08623	0,313360
x_2x_3	-4,1175	4,191093	0,98244	0,358612

Figura 11 – Modelo de superfície de resposta para atividade PG (U) em função da concentração de NaCl e do pH do tampão de extração, a 52h. As condições experimentais do ponto central (0,0) foram NaCl = 1,0 M, pH = 6,0 e t = 28 h (Tabela 5).

Segundo o modelo, as melhores condições de extração PG ocorrem a pH 4,40, por 25 h, a uma concentração de NaCl de 1,00 M. Uma vez que os valores máximos de atividade PG, obtidos experimentalmente, ocorreram a pH 4,0 (Tabela 5, experimentos 3 e 7; Figura 11), fez-se necessário o estudo da extração enzimática em valores próximos a pH 4,0 (Tabela 5, experimentos I a III). Após a realização dos ensaios, verificou-se que o maior valor de atividade PG ocorreu em pH 4,0. Um novo experimento foi realizado a pH 5,0, dado que a atividade específica da PG, expressa em nmol de ácido galacturônico formado/mg de proteína, foi afetada pela solubilização da proteína neste valor de pH. O maior valor de atividade enzimática encontrado foi quando a extração ocorreu em pH 4,5. Os resultados mostraram que o melhor pH para a extração PG de mandioquinha é em pH 4,0 (Figura 11). Este

valor de pH não foi encontrado na literatura para a extração da enzima de outras fontes. No entanto, valores próximos a este pH foram usados na extração de PG em muitos trabalhos (Tabela 4). O valor de pH utilizado neste estudo, para a detecção de atividade PG, foi 4,4, muito próximo ao pH de extração encontrado, que foi 4,0. No entanto, em nenhum dos trabalhos consultados, foi determinado o pH ótimo de extração da enzima.

Os maiores valores de atividade enzimática foram observados após 25 h de agitação do extrato enzimático. Como no caso da PE, determinou-se que o tempo de extração para ensaios posteriores seria de 4 h, considerando-se que esta variável não fora significativa (Tabelas 8 e 9, $p=0,13$) e que, com a redução do tempo de extração, ter-se-ia otimizado o método de extração. Os resultados mostraram que, mesmo após 4 h de agitação, a extração PG foi maior que em outros experimentos, onde o tempo de extração era mais longo (Tabela 5, experimentos II a IV), comportamento também observado no caso da PE. Na maioria dos trabalhos relacionados à extração PG, o tempo de extração é inferior a 4 h (Tabela 4), embora os autores não o tenham otimizado. Nesse caso, o que contribuiu para o aumento da atividade PG em um tempo de extração mais curto pode ter sido a combinação com a otimização das outras variáveis (concentração de NaCl e pH do extrato enzimático). Além disso, tempos muito longos de extração favorecem a degradação da enzima.

A concentração de NaCl, utilizada para otimizar a extração da enzima, foi de 1,0 M, o mesmo valor estimado pelo modelo. Este resultado está de acordo com outros trabalhos encontrados na literatura, que utilizaram esta mesma concentração de NaCl na extração de enzimas de outras fontes (Tabela 4).

Figura 12 – Atividade PE e PG dos extratos preparados a pHs 3,5 a 8,5, sob as mesmas condições de concentração de NaCl (1,0 M) e de tempo de extração (4h).

Os resultados referentes à extração de enzimas pécticas de mandioquinha sofreram pouca influência do tempo de extração e da concentração de NaCl para as duas enzimas, que foram facilmente solubilizadas após 4 h de agitação, a 4° C, sinalizando não se tratar de uma variável crítica. A única variável significativa foi o pH de extração, 7,5 e 4,0, para a extração de PE e PG, respectivamente. Quando a extração de ambas as enzimas (PE e PG) for desejável e se pretender utilizar somente um método de extração, o pH de extração pode ser ajustado para 7,5, pois, a pH 8,0 também é possível se extrair a PG (Figura 11 (c)). Por outro lado, em pHs ácidos, a extração de PE não é recomendada (Figuras 10 (a) e (b)). A otimização do processo é ilustrada na Figura 12, onde os maiores valores de atividade PE e PG ocorreram a pH 7,5 e 4,0, respectivamente.

O modelo de superfície de resposta apresentou valores altos de R^2 , de 0,83 e 0,87 para PE e PG, respectivamente. O ajuste do modelo pode ser ilustrado pela curva de respostas obtidas experimentalmente *versus* os valores previstos pelo modelo (Figura 13), que devem se posicionar o mais próximo possível da reta diagonal, em vermelho.

Figura 13 – Respostas do MSR medidas *versus* valores previstos para a extração das enzimas PE (a) e PG (b) em mandioquinha-salsa.

4.2 – Atividade PE e PG durante o período pós-colheita e alterações de textura

A Figura 14 mostra as alterações nas atividades PE e PG durante o período de estocagem das raízes de mandioquinha-salsa, nas seis diferentes condições de armazenamento.

A atividade PE diminui em todas as condições no terceiro dia de armazenamento.

Quando as raízes foram armazenadas à temperatura ambiente e sem embalagem, a atividade PE apresentou uma queda em sua atividade enzimática no terceiro dia pós-colheita, mantendo-se estável até o quarto dia de armazenamento (Figura 14a). Neste ponto, a atividade enzimática alcançou cerca de 67% de sua atividade inicial. Ao contrário, a atividade PG aumentou do 1º ao 3º dia de estocagem, apresentando-se estável até o final do período (Figura 14b). Nestas condições, as raízes apresentaram amolecimento constante durante a estocagem na região do floema da raiz (Figura 15b). Observações macroscópicas evidenciaram um aumento no grau de deterioração das raízes na superfície do tubérculo, após o final do período de armazenamento (Figura 16).

Figura 14 – Atividade PE (a) e PG (b) de raízes de mandioca durante o período pós-colheita, sob diferentes condições de estocagem: à temperatura ambiente (25° C - ■-), a 25° C, sob acondicionamento a vácuo (●-), e lavagem com hipoclorito (▲-), a 4° C sem lavagem (▼-), a 4° C, sob acondicionamento a vácuo (◆-) e lavagem com hipoclorito (▼-).

Figura 15 – Medida de energia de penetração das raízes tuberosas de mandioquinha durante o período pós-colheita, sob diferentes condições de estocagem: à temperatura ambiente (25° C - -■-), a 25° C, sob acondicionamento a vácuo (-●-), e lavagem com hipoclorito (-▲-), a 4° C sem lavagem (-▼-), a 4°C, sob acondicionamento a vácuo (-◆-) e lavagem com hipoclorito (-◀-), na região do xilema (a) e do floema (b) da planta.

Figura 16 – Raízes de mandioca armazenadas à temperatura de refrigeração (a e c) e ambiente (b e d), sem embalagem, no terceiro e nono dias de estocagem. Após o armazenamento a temperatura ambiente, as raízes apresentaram maior grau de lesões superficiais e de escurecimento quando comparadas às raízes refrigeradas.

Figura 17 – Corte transversal de raízes de mandioca-salsa após quatro dias de armazenamento à temperatura ambiente, sob acondicionamento a vácuo. As setas na figura indicam os pontos de gás produzidos na região do xilema da planta, onde o amolecimento também foi observado.

As raízes armazenadas à temperatura ambiente, sob acondicionamento a vácuo, apresentaram uma diminuição na atividade de ambas as enzimas no terceiro dia pós-colheita, e mostraram um aumento substancial no quarto dia (Figura 14). No quarto dia, as raízes se degradaram completamente, com amolecimento substancial e produção de gás e açúcares, que podem ser observados nas Figuras 18 e 19 e 20b. O maior grau de amolecimento das raízes tuberosas ocorreu no 4º dia (Figura 15). A lavagem das raízes com hipoclorito não teve alteração significativa na firmeza das raízes em relação às raízes não lavadas ($p>0,05$).

O aumento das atividades PE e PG nos extratos de mandioquinha-salsa pode estar relacionado não só a enzimas endógenas, presentes naturalmente nas raízes, como também à presença de microrganismos produtores de enzimas pécticas. A presença de bactérias do gênero *Erwinia* pode estar relacionada ao incremento da atividade enzimática. A bactéria está presente no solo, que sob a condição escolhida de embalagem, a vácuo, pode favorecer o crescimento deste microrganismo anaeróbio facultativo. Neste caso, as condições de armazenamento são seletivas para o crescimento de uma série de outros microrganismos. Quando incubada em anaerobiose, a bactéria diminui o seu grau de crescimento; no entanto, a produção da enzima pectato liase duplica nestas situações, justificando o amolecimento do tecido (Pérombelom, 2002), que também foi verificado nestas condições de armazenamento. No entanto, a perda de textura ocorre de forma mais acentuada em algumas partes do tubérculo, que exibiram, visualmente, produção de gás e exudação acentuada de líquidos.

Figura 18 – Raízes de mandioca armazenadas à temperatura ambiente (25°C), sob acondicionamento a vácuo, durante 5 dias. As raízes apresentaram sintomas de infecção por podridão-mole, como exudação de água excessiva e produção de gás.

As raízes tuberosas lavadas com hipoclorito, armazenadas à 25° C sob acondicionamento a vácuo, apresentaram atividade pectinolítica semelhante a das raízes não lavadas e estocadas sob as mesmas condições: diminuição da atividade PE e PG do 1º ao 3º dia de armazenamento, seguidos de um aumento de atividade de ambas as enzimas no 4º dia de estocagem (Figuras 14 a e b). O maior grau de amolecimento das raízes ocorreu nesta condição de estocagem, tanto na região do xilema, quanto na região do floema da planta (Figura 15). Não houve diferença significativa na atividade das enzimas PE e PG para as raízes lavadas (grupo 3) ou não (grupo 2) com hipoclorito, exceto no 4º dia pós-colheita, onde a atividade PG foi significativamente maior para as raízes não lavadas ($p=0,013106$), quando o armazenamento ocorreu à temperatura ambiente.

As raízes armazenadas sob temperatura de refrigeração doméstica (4°C) e sem embalagem, apresentaram uma diminuição das atividades PE e PG no terceiro dia de armazenamento. A atividade PE diminuiu progressivamente até o 7º dia de armazenamento, seguida de um aumento no 9º dia pós-colheita (Figura 14a). Por outro lado, a atividade PG apresentou um pequeno aumento da atividade enzimática no 5º dia, com a subsequente e constante diminuição da atividade enzimática entre os dias 7 e 11 pós-colheita (Figura 14b). Nestas condições de estocagem, o amolecimento das raízes nas regiões do xilema e do floema também foi observado

no 3º dia de estocagem, apresentando um aumento gradual na medida de energia de penetração até o 7º dia pós-colheita (Figura 15).

Para as raízes estocadas a 4º C, sob acondicionamento a vácuo, as curvas de atividade PE e PG, ao longo do período de armazenamento, apresentaram-se bastante similares às curvas das raízes armazenadas sob as mesmas condições e lavadas com hipoclorito. Exceção a esse comportamento deveu-se apenas à atividade PE, no terceiro dia pós-colheita, que apresentou um aumento significativo ($p=0,000037$) na atividade quando as raízes tuberosas foram previamente higienizadas (Figura 14). A atividade PE diminui até o 5º dia pós-colheita, aumentando progressivamente até o 11º e último dia de estocagem. Já a atividade PG apresenta uma redução em sua atividade pectinolítica no 3º dia pós-colheita, acompanhada de um aumento no quinto dia, seguido de diminuição progressiva até o 11º dia pós-colheita. Este comportamento sugere que a lavagem das raízes não provocou nenhuma alteração em relação ao seu tempo de estocagem, exceto no 7º dia pós-colheita, quando a atividade PG foi menor nas raízes não higienizadas ($p=0,015176$). Deve-se mencionar também que a lavagem das raízes apresentou um inconveniente, quando o armazenamento ocorreu à 4º C: foi observada a saída da água de lavagem absorvida pelo tecido foi exudada durante a estocagem. No entanto, não foi observada a produção de gás nesta condição de acondicionamento. As raízes apresentaram amolecimento na região do floema, entre os dias 7 e 9 pós-colheita, que pode estar relacionado à atividade das enzimas pécticas (Figura 15).

Considerando-se que o aumento da atividade pectinolítica acompanha o amolecimento das raízes de mandioquinha-salsa, contribuindo para a diminuição de seu tempo de estocagem, o acondicionamento a vácuo pode representar uma solução para aumentar o tempo de vida-de-prateleira da mandioquinha. A perda de textura, neste experimento, também está relacionada à temperatura, uma vez que as raízes, armazenadas a 4º C, apresentaram valores similares de perda de textura, com ou sem embalagem a vácuo.

As raízes estocadas sob refrigeração doméstica (4º C) apresentaram um aumento no seu tempo de conservação face às armazenadas à temperatura ambiente (25º C), principalmente as raízes acondicionadas a vácuo. As atividades PE e PG apresentaram maiores valores quando as raízes foram armazenadas à temperatura ambiente. Para avaliar o efeito dos tratamentos (temperatura e embalagem a vácuo), a ANOVA Fatorial seguida de teste de Tukey HSD aponta

diferença significativa de atividade PE no 3º dia pós-colheita para as raízes embaladas a vácuo e armazenadas a 4º C ($p=0,001456$). A análise foi realizada no terceiro dia de armazenamento por ser o único dia em comum para todos os tratamentos. Para a atividade PG, houve diferença significativa somente para as raízes não embaladas e armazenadas à temperatura ambiente ($p=0,000635$) (Ver Anexo 1, Figuras A e B).

Quanto ao amolecimento das raízes, as amostras armazenadas a vácuo e à temperatura de refrigeração apresentaram valores de firmeza na região do xilema estatisticamente iguais às raízes embaladas a vácuo ou não e armazenadas à temperatura ambiente e estatisticamente diferente em relação às raízes não embaladas e armazenadas sob refrigeração ($p=0,011214$) (ver Anexo 1 – Figura C). Quanto à região do floema da planta, a firmeza apresentou-se estatisticamente igual para as raízes embaladas a vácuo e armazenadas a 4º C em relação às raízes estocadas a 25º C, acondicionadas ou não a vácuo, apresentando-se estatisticamente diferentes das raízes não embaladas, armazenadas a 4º C no terceiro dia pós-colheita ($p=0,008615$) (ver Anexo 1 – Figura D). Os mesmos resultados foram observados para as medidas de energia de penetração, tanto na região do xilema quanto na região do floema da planta.

A Tabela 10 mostra o comprimento e o diâmetro das raízes utilizadas na determinação de firmeza. A média global do tamanho das raízes mostra que as amostras utilizadas neste experimento eram similares. As diferenças nos valores de firmeza, observados nas raízes, não devem ser atribuídas a diferenças entre as dimensões das amostras. Quando as raízes foram fornecidas, objetivou-se estudar aquelas que apresentassem as mesmas características, considerando que raízes de tamanho e diâmetro diferentes apresentam alterações de textura entre si. Avelar-Filho (1989) verificou que raízes menores apresentavam maior perda de peso que raízes médias e grandes devido à perda de água para o ambiente, uma vez que esta taxa é função direta da relação superfície/volume. A perda de peso das raízes afetaria, diretamente, a textura da planta.

Avelar-Filho (1989) também verificou que o aumento da vida de prateleira da mandioquinha ocorreu quando as raízes foram conservadas em câmara fria (5ºC) e com proteção de filmes de polietileno de baixa densidade, sem vácuo, quando comparadas às raízes armazenadas à temperatura ambiente. O uso da embalagem associado à refrigeração também foi um fator positivo na conservação das raízes.

Tabela 10 – Dimensões das raízes de mandioquinha-salsa, para a determinação da firmeza, armazenadas sob as diferentes condições de ensaio.

Dimensões (cm)	Condições de estocagem						Média global
	25° C ¹	25° C, vácuo ¹	25° C, vácuo + lavagem ¹	4°C ²	4°C, vácuo ²	4°C, vácuo + lavagem ²	
Comprimento	13,2 ± 1,4	12,9 ± 2,7	12,7 ± 1,6	13,3 ± 1,9	12,4 ± 2,0	13,0 ± 2,7	12,9 ± 2,1
Diâmetro	4,0 ± 0,6	4,2 ± 0,7	4,0 ± 0,5	4,2 ± 0,4	4,2 ± 0,4	4,1 ± 0,4	4,1 ± 0,5

Média e desvio padrão de nove (1) e dezoito (2) raízes diferentes, analisadas para a determinação da firmeza, durante o período de estocagem.

O amolecimento de frutas e vegetais durante o amadurecimento é atribuído, frequentemente, à degradação enzimática da parede celular (Abu-Sarra & Abu-Goukh, 1992). As enzimas pécticas têm sido identificadas e caracterizadas em diversos tipos de frutas e vegetais, tais como a batata (Tijssens *et al.*, 1997; Puri *et al.*, 1982), cenoura (Ly-Nguyen *et al.*, 2002), goiaba (Abu-Goukh & Bashir, 2003), acerola (Assis *et al.*, 2001), papaya (Fayyaz *et al.*, 1993), ervilha (Laats *et al.*, 1997), maçã (Castaldo *et al.*, 1989), tomate (Jackman *et al.*, 1995; Pressey & Woods, 1992), laranja (Hou *et al.*, 1997), pêssego (Javeri & Wicker, 1991), kiwi (Wegrzyn & MacRae, 1992), manga (Ketsa *et al.*, 1998), pêra (Nagel & Patterson, 1967), morango (Nogata *et al.*, 1993) e banana (Pathak *et al.*, 2000). Aumentos da atividade PE e PG foram observados durante o amadurecimento de goiaba, na qual a atividade PG foi diretamente relacionada, segundo os autores, à perda de firmeza dos frutos (Abu-Goukh & Bashir, 2003). Resultados similares foram obtidos por Abu-Sarra e Abu-Goukh (1992) e Wegrzyn e MacRae (1992) para PE e PG de manga e kiwi, respectivamente. Frutos de manga armazenados em câmara de temperatura controlada, a 38° C, apresentaram uma diminuição da atividade PG em relação aos frutos não tratados nesta temperatura, nos quais a atividade enzimática aumentou durante o período de armazenamento. No mesmo estudo, a atividade PE diminuiu em ambos os casos. Entretanto, a atividade enzimática inicial dos frutos não tratados

apresentou-se maior, mostrando que o tratamento térmico inibe o aumento da atividade PE e PG durante a estocagem (Ketsa *et al.*, 1998).

Em estudo realizado com manga “keiti”, armazenada à 4° C, verificou-se que a atividade PG é uma das principais responsáveis pelo amolecimento da fruta durante a fase de armazenamento, com um aumento de atividade enzimática de 24 para 32 U durante seis meses de estocagem. Por outro lado, a atividade PE reduziu-se gradativamente durante o estágio de amadurecimento do fruto (de 124 a 80 U), levantando a hipótese da enzima não ser uma das principais responsáveis pelo amolecimento da fruta (Roe & Bruemmer, 1981). Em pêssego, o aumento da atividade PG também coincidiu com o amolecimento dos frutos, variando de zero a 6,5 unidades/mL de extrato, durante seis dias de armazenamento à temperatura ambiente. Quando comparada a outros frutos, a atividade da enzima em pêssego foi considerada muito baixa pelos autores. Mesmo assim, eles defendem a hipótese da enzima ser uma das principais responsáveis pelo amolecimento da fruta (Pressey *et al.*, 1971).

Em abacates, durante 12 dias de armazenamento, a atividade PG não foi detectada até o 8° dia de estocagem, período que coincidiu com o 3° dia de climatério e com o amolecimento contínuo da fruta. No entanto, a atividade PE diminuiu neste período, estabilizando-se em baixo índice até o final do período de armazenamento (Awad & Young, 1979). Em kiwi, resultados similares foram apontados: a atividade PG não foi detectada até o 25° dia pós-colheita, sendo verificada apenas após o 30° dia, considerado o estágio final de amadurecimento da fruta (Bonghi *et al.*, 1996).

Uma forte associação entre o amolecimento e as atividades PE e PG foi estabelecida em tomates. A atividade PG foi medida pelo aumento de viscosidade do meio de reação, que variou de 0 a 15% em 15 dias de armazenamento. A atividade PE também aumentou (de 57 a 63 U) (Bruescher & Tigchelaar, 1975). Em carambola, a taxa de amolecimento da fruta foi relacionada diretamente com um aumento gradual nas atividades das principais enzimas de parede celular: PG, PE, β -galactosidase e β -(1,4)-glucanase (Ali *et al.*, 2004).

Uma atividade PE inicial elevada, sucedida de sua própria redução, caracteriza um processo inicial de desesterificação na degradação da parede celular (Cardarelli *et al.*, 2002). A diminuição da atividade PE também foi verificada em

outros frutos, como pêssego, banana, damasco e melão (Botondi *et al.*, 2000; Cardarelli *et al.*, 2002; Kanellis Cardarelli *et al.*, 2002., 1989; Glover *et al.*, 1994).

O amolecimento da mandioquinha parece estar relacionado à atividade de ambas as enzimas. Embora a atividade PG tenha se reduzido a partir do 5º dia, durante o período de armazenamento, quando as condições de estocagem favoreceram o crescimento microbiano, a atividade enzimática aumentou bruscamente, acompanhada de degradação e amolecimento da planta. Neste caso, trata-se, possivelmente, de enzimas endógenas e exógenas, provenientes do próprio tubérculo e/ou de microrganismos oportunistas. Entretanto, as medidas de textura são muito difíceis de serem realizadas uma vez que o amolecimento não ocorre de modo homogêneo nas raízes.

Dois tipos de determinação de textura foram aplicados nas raízes de mandioquinha: a análise de firmeza (N), que mede a força máxima de resistência do tecido, e a energia de penetração (J), para realizar o cálculo da área relacionada à distância de penetração *versus* a força. Ambas as análises são importantes para a compreensão da perda de textura da planta, principalmente no caso da mandioquinha, onde o amolecimento não ocorre de modo homogêneo. A Figura 19 representa exemplos de análise de textura das raízes, realizados durante o período de armazenamento. Os testes foram realizados no 4º dia pós-colheita, abrangendo as raízes que apresentaram o maior grau de amolecimento (armazenamento à temperatura ambiente, sob acondicionamento a vácuo e lavagem prévia com hipoclorito). A diferença de textura e o grau de amolecimento numa mesma amostra variam como expostos nos gráficos: as Figuras 18a e 18b representam gráficos típicos para a análise deste tipo de amostra, quando não ocorre amolecimento, enquanto as Figuras 18c e 18d evidenciam a falta de resistência do tecido da planta durante a realização do ensaio, para as partes lesionadas. Em geral, as raízes mais íntegras apresentam um perfil de análise bem próximo às Figuras 19a e 19b, com alterações restritas à força máxima de penetração. Em razão destas diferenças de curvas para as raízes deterioradas, as análises de energia de penetração e força máxima são necessárias, embora somente a primeira tenha sido abordada no presente trabalho. Os gráficos de força máxima apresentaram um perfil muito similar aos de energia de penetração para as amostras que não apresentaram muita variação em seu grau de amolecimento (em geral, as armazenadas à temperatura de refrigeração).

A textura ou amolecimento é um atributo físico associado à qualidade e ao tempo de estocagem de frutas e vegetais. O amolecimento envolve alterações estruturais e de composição de vários carboidratos da parede celular como resultado da ação enzimática. Durante o amolecimento, as pectinas aumentam drasticamente o seu grau de depolimerização que, em alguns frutos e vegetais, é acompanhado do aumento do nível de água (Ali *et al.*, 2004). O amolecimento pode ser retardado através do uso de baixas temperaturas de estocagem. No presente trabalho, a temperatura de refrigeração favoreceu a manutenção da firmeza das raízes. Ali *et al.* (2004) verificaram que a carambola, estocada a 10° C, apresentou uma perda de textura retardada em relação à fruta armazenada à temperatura ambiente, que apresentou perda de textura gradual. Filmes de polietileno de baixa densidade também foram utilizados em testes com carambola. O uso combinado de baixa temperatura e embalagem mostrou-se efetivo na manutenção da textura da fruta, retardando o seu amolecimento. Em tomates, também foi verificada a associação entre a perda de firmeza e o aumento de temperatura de estocagem: a 25° C, o menor grau de firmeza foi observado no 6° dia de armazenamento, enquanto a 15° C, a maior perda de textura foi no 18° dia. A atividade PG está associada à perda de textura dos tomates e apresenta uma redução de sua atividade com o aumento da temperatura de estocagem (Mostofi *et al.*, 2003).

Figura 19 – Exemplos de testes de energia de penetração. Os testes foram realizados no 4º dia pós-colheita (final do período), na região do xilema de raízes tuberosas de mandioquinha-salsa, lavadas com hipoclorito e armazenadas à 25°C, sob acondicionamento a vácuo. As Figuras a, b, c e d representam o resultado de perfurações em diferentes pontos da região do xilema, que apresentaram graus variados de deterioração e amolecimento da planta.

Embora as enzimas pécticas já tenham sido identificadas em algumas raízes, como batata e cenoura, mencionadas anteriormente, poucos são os trabalhos que apresentam a atividade destas enzimas durante o período pós-colheita, o que gera dificuldades à comparação com os dados obtidos no presente trabalho, principalmente pelo fato do amolecimento durante a estocagem não ser uma característica observada em raízes como batata, batata-doce, mandioca e inhame.

As raízes de mandioquinha, armazenadas à temperatura ambiente e de refrigeração, sem acondicionamento a vácuo, são mostradas na Figura 16. Quando refrigeradas, as raízes desenvolvem um menor grau de lesões superficiais e de

escurecimento. O armazenamento a 25° C (Figuras 16b e 16d) parece favorecer a atividade de enzimas responsáveis pelo escurecimento enzimático (peroxidases, polifenoloxidasas etc) e de contaminação superficial por bolores e/ou leveduras, que necessitam de oxigênio para se multiplicar, e por isso não crescem em anaerobiose. Nas raízes embaladas a vácuo (Figura 20) não foram observadas lesões, mesmo quando o armazenamento ocorreu à temperatura ambiente. Entretanto, foi observada uma grande quantidade de água exudada pelo tecido (Figura 20B₂).

Figura 20 – Raízes de mandioca armazenadas à (A) temperatura de refrigeração e (B₁ e B₂) ambiente, sob acondicionamento a vácuo, no quinto dia de armazenamento. As raízes apresentaram sintomas de infecção por podridão-mole, como exudação de água excessiva (B₂) e produção de gás (B₁ e B₂) quando estocadas à temperatura ambiente.

A melhor forma de armazenamento das raízes ocorreu sob acondicionamento a vácuo, à temperatura de refrigeração (Figura 21). Neste período, uma pequena quantidade de água começou a ser liberada pela planta.

Figura 21 – Raízes de mandioca armazenadas à temperatura de refrigeração sob acondicionamento a vácuo, no nono dia de armazenamento.

4.3 – Atividade pectato liásica

Pectato liases são produzidas por uma série de bactérias e fungos patogênicos e já foram identificadas, também, em plantas, como o morango e a banana (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002; Payasi & Sanwal, 2003; Marin-Rodríguez *et al.*, 2003; Lohani *et al.*, 2004). Devido à sua ação na parede celular de frutos e vegetais e à importância de doenças relacionadas ao amolecimento da planta, como a podridão-mole, o papel da pectato liase na parede celular vem sendo estudado em conjunto com outras enzimas (Chapple & Carpita, 1998). No caso das raízes de mandioca, a quantificação da atividade de enzima poderia sinalizar a presença de contaminação microbiana. Considerando estudos anteriores de doenças de raízes amilolíticas, relacionados à batata, ao inhame, à batata-doce, e à própria mandioca, a podridão-mole é um grande problema a ser enfrentado pelos agricultores. A *Erwinia carotovora*, já identificada anteriormente em mandioca

como causadora da doença, produz enzimas pectinolíticas – e, dentre elas, a pectato liase. A idéia de se estudar este grupo de enzimas se deveu à necessidade de entendimento dos processos degradativos pós-colheita, sofridos pela mandioquinha.

No início deste trabalho, imaginava-se que os principais mecanismos de deterioração da mandioquinha decorriam da ação de enzimas endógenas, ou seja, provenientes da própria planta. Entretanto, no decorrer dos experimentos, verificou-se que os processos de deterioração poderiam ser de origem externa – principalmente quando as raízes foram acondicionadas a vácuo e armazenadas a 25° C. Considerando-se que as medidas de atividade PE e PG não distinguiam o tipo de mecanismo (interno ou externo), fez-se necessário o estudo de um grupo de enzimas pectinolíticas associadas à contaminação microbiana, embora já identificadas em plantas.

Os resultados apontam a presença da enzima em todas as raízes – um resultado coerente, visto que a contaminação da planta pode ocorrer no solo (Figura 22). No entanto, o acondicionamento a vácuo, sob condições ambientes, promove o crescimento da bactéria anaeróbia facultativa. O aumento da atividade pectato-liásica, no quarto dia de armazenamento, é um forte indício da infecção das raízes por bactérias que levam à podridão-mole. A lavagem com hipoclorito não apresentou diferença significativa entre os grupos 2 e 3 para a atividade PL. Entretanto, quando o armazenamento ocorreu a 4° C (grupos 4 e 5), foi detectada diferença significativa na atividade PL no 9° dia pós-colheita ($p=0,017364$). Em relação ao efeito dos tratamentos, não foram observadas diferenças significativas para a atividade PL entre as amostras armazenadas ($p>0,05$), mostrando que os tratamentos (acondicionamento a vácuo e temperatura) não influenciaram a atividade PL no terceiro dia de armazenamento.

As raízes armazenadas sob acondicionamento a vácuo e temperatura ambiente apresentaram um alto grau de deterioração (amolecimento excessivo, produção de gás de odor desagradável e característico, além da formação de açúcares) (Figuras 17, 18 e 20b). Afora as informações encontradas na literatura, a suspeita da presença de *Erwinia carotovora* se baseou no fato da bactéria apresentar produção de gás (a partir de D-glicose), de H_2S (a partir de cisteína), e de ácido (a partir de maltose, L-arabinose, manose, celobiose, lactose, ramnose, trealose e alfa-metil glicosídeo) (Romeiro *et al.*, 1988). Nas raízes embaladas a vácuo

e armazenadas à temperatura ambiente, foi observada a produção de gás e o declínio dos níveis de pH, decorrente da produção de ácido. Além disso, o material se mostrou bastante viscoso (Figura 18). A pectato liase, produzida por *Erwinia caratovora*, gera esse tipo de complexo (Gummadi & Panda, 2003; Senchenkova *et al.*, 2003).

Figura 22 – Atividade pectato-liásica de raízes de mandioquinha-salsa durante o período pós-colheita, sob diferentes condições de armazenamento: à temperatura ambiente (25° C - ■-), a 25° C, sob acondicionamento a vácuo (●), e lavagem com hipoclorito (▲), a 4° C sem lavagem (▼), a 4° C, sob acondicionamento a vácuo (●) e lavagem com hipoclorito (◆).

Com o objetivo inicial de reduzir a carga microbiana, as raízes foram higienizadas com hipoclorito. No entanto, a lavagem apresentou um efeito inverso ao esperado: o tratamento provocou o aumento da atividade de água no tecido favoreceu o crescimento microbiano e as raízes armazenadas a vácuo, sob temperatura ambiente e, após a lavagem, apresentaram um maior grau de deterioração e produção de gás em relação às não lavadas, armazenadas sob as mesmas condições. O maior valor de atividade PL foi detectado no 5º dia pós-colheita, observado nas raízes estocadas à temperatura ambiente e sob acondicionamento a vácuo, lavadas previamente com hipoclorito (Figura 22), que pode estar relacionada à contaminação microbiana.

O crescimento da bactéria e, conseqüentemente, da atividade pectato liásica, é favorecido pela ausência de oxigênio, a temperaturas mais altas. Em temperatura de refrigeração, a enzima apresentou atividade semelhante para todas as outras formas de armazenamento (com ou sem vácuo, lavada ou não com hipoclorito) (Figura 22).

Sendo uma enzima pectinolítica, a PL é também responsável por alterações de textura em frutos e vegetais. Lohani *et al.* (2004) verificaram, além do aumento da atividade PG e PE, um acréscimo da atividade PL em bananas durante o amadurecimento, que apresentou relação direta com o amolecimento do tecido.

4.4 – Atividade celulásica

As substâncias pécticas e as celulosas são carboidratos abundantes, presentes em plantas, encontrados na parede celular e na lamela média, e contribuem para a manutenção da firmeza e da estrutura da planta. Essa composição torna as frutas e vegetais substratos naturais importantes para as enzimas pectinolíticas e celulásicas (Gummadi & Panda, 2003).

As celulasas, assim como as enzimas pécticas, representam um importante papel no processo deteriorativo de frutos e vegetais, promovendo perda de textura do tecido, uma vez que a enzima atua na parede celular do vegetal. Alguns autores consideram a degradação da matriz de celulose como causa primária do amolecimento de frutos (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002).

Em raízes de mandioquinha não foi detectada a atividade celulásica (CL) até o quarto dia de armazenamento ou a atividade detectada foi muito baixa (Figura 23).

Nos dias 3 e 4 após a colheita, houve diferença significativa na atividade CL entre os grupos 2 e 3 em relação à lavagem com hipoclorito (no 3º dia pós-colheita, $p=0,01277$ e no 4º dia, $p=0,009935$). Entretanto, a partir do sétimo dia, houve um aumento na atividade celulásica nas raízes armazenadas à 4º C, com e sem embalagem. As raízes lavadas com hipoclorito, armazenadas a 4º C e embaladas, apresentaram um aumento significativo da atividade no 7º dia ($p=0,006959$), seguida de uma diminuição no 9º dia pós-colheita (Figura 23). Esse aumento na atividade enzimática após o 5º dia pode ser atribuído à metodologia de detecção, que pode provocar essas alterações (os desvios observados são muitos grandes), principalmente pelo fato de se utilizar como substrato a CMC, que não é o substrato nativo de celulasas de plantas. Estes resultados indicam que o amolecimento das raízes de mandioquinha, durante o período de armazenamento, não está relacionado à ação das enzimas celulásicas, ao contrário de outros grupos de enzimas, como a PE, PG e PL, que também atuam na parede celular do vegetal.

Em relação ao efeito dos tratamentos, assim como para a atividade PL, não foram observadas diferenças significativas para a atividade CL entre as amostras armazenadas no terceiro dia de estocagem ($p>0,05$).

A atividade celulásica já foi identificada em outras fontes, como papaya (Jiang *et al.*, 2003), manga e goiaba (El-Zoghbi, 1994), que apresentaram valores de atividade celulásica de 33,0, 28,8 e 73,1, respectivamente. Nestes frutos, a atividade celulásica também foi relacionada à perda de textura da matriz vegetal.

Figura 23 – Atividade celulásica do extrato de raízes de mandioca-salsa durante o período de armazenamento, sob diferentes condições de estocagem: à temperatura ambiente (25° C - ■-), a 25° C, sob acondicionamento a vácuo (●-), e lavagem com hipoclorito (▲-), a 4° C sem lavagem (▼-), a 4°C, sob acondicionamento a vácuo (◆-) e lavagem com hipoclorito (▲-).

Diferentemente da mandioca, a atividade celulásica em manga “keiti” é uma das principais responsáveis pelo amolecimento da fruta no processo de amadurecimento (de 24 a 49 U, durante 6 meses de estocagem a 4° C) (Roe & Bruemmer, 1981). Em abacates, ao contrário do que ocorre com a PE, a atividade celulásica aumenta consideravelmente após o 7° dia pós-colheita, que coincide com a elevação da produção de etileno e com o início do amolecimento (Awad & Young, 1979). Nesse estudo, a enzima mostrou-se como a principal responsável pelo

amolecimento do fruto. Resultados similares foram encontrados por Pesis *et al.* (1978).

Hilton e Pressey (1974) detectaram atividade celulásica durante o armazenamento de pêssegos por cinco dias à temperatura ambiente, coincidindo com o amadurecimento do fruto. O aumento da atividade celulásica sugere que a enzima, associada a outras enzimas hidrolíticas, contribui para o amolecimento do fruto. Não foram encontrados trabalhos relacionados à atividade deste grupo de enzimas em outros tubérculos similares à mandioquinha, como a batata e a mandioca.

Em abacates, a atividade celulásica não foi detectada no primeiro dia pós-colheita. Entretanto, foi detectado um aumento significativo no 4º dia, aumentando 13,4 vezes no 8º dia de armazenamento à 20º C (Jeong *et al.*, 2002). Um aumento gradativo da atividade celulásica também foi detectado por Zauberman & Jobin-Decor (1995) em abacates, que registraram um aumento gradativo na atividade enzimática a cada semana de estocagem, durante 1 mês, quando os frutos foram armazenados à 8º C. Quando o armazenamento ocorreu a 2º C, não foi observada atividade celulásica.

Assim como as enzimas pécticas, a celulase é também uma das principais enzimas responsáveis pelo amolecimento de tomates, onde a atividade enzimática aumentou de 7 a 45% da viscosidade do meio de reação, durante 15 dias de armazenamento à temperatura ambiente (Bruescher & Tigchelaar, 1975).

4.5 – Atividade amilolítica, amido total e açúcares redutores

A Figura 24 mostra as alterações na atividade amilolítica (AM) dos extratos de mandioquinha-salsa durante o período de armazenamento. Do terceiro ao quinto dia pós-colheita, a atividade enzimática aumenta em todas as condições de estocagem (exceto nas raízes armazenadas a 4º C, sem embalagem), diminuindo progressivamente até o nono dia.

À temperatura ambiente, o aumento da atividade amilolítica no terceiro dia coincide com a diminuição do teor de amido total, presente na planta, e com o aumento do teor de açúcares redutores, o que representaria o consumo de substrato e formação de produto, durante o processo de hidrólise do amido (Figura 24). Estes resultados mostram que a ação das enzimas amilolíticas pode representar um

importante papel na deterioração pós-colheita das raízes, uma vez que a hidrólise do amido resulta na formação de grupos redutores, substrato para microrganismos oportunistas, capazes de acelerar o processo deteriorativo. O teor de açúcares redutores diminuiu no quarto dia, mostrando um possível crescimento de microrganismos nestas condições de estocagem, com consumo de substrato. Neste ponto, as raízes não são indicadas para consumo, pois apresentam alto grau de deterioração, com manchas marrons em sua superfície e exudação de água.

Para as raízes armazenadas à 25° C, sob acondicionamento a vácuo, a atividade amilolítica apresentou o mesmo perfil, tanto para as raízes lavadas como para as não lavadas com hipoclorito (Figura 24a). Entretanto, o consumo de amido foi maior nas raízes não lavadas no terceiro dia pós-colheita (Figura 24c), que coincidiu com um acúmulo de açúcares no quarto dia de armazenamento (Figura 24b), que apresentou um aumento significativo ($p=0,006422$).

As raízes armazenadas a 4° C apresentaram gráficos de atividade amilolítica com formatos semelhantes entre si a partir do 5° dia pós-colheita, exceto para o 3° dia, onde o grupo 2 apresentou diferença significativa em relação ao grupo 3 ($p=0,003823$). Em geral, as raízes embaladas e lavadas apresentaram uma atividade amilolítica mais elevada em todos os estágios, à exceção dos dias 3 e 11 pós-colheita, no qual os extratos preparados a partir das raízes não lavadas apresentaram atividade amilolítica mais alta apesar de não apresentarem diferenças significativas em relação às raízes não lavadas. O aumento da atividade amilásica ocorreu no quinto dia de armazenamento e um pequeno aumento da concentração de grupos redutores foi observado no sétimo dia de estocagem. Para este grupo de raízes armazenadas a vácuo, nesta temperatura, houve um aumento gradual no teor de amido total do 3° ao 9° dia de estocagem. É possível que, sob tais condições, a perda de água durante o armazenamento responda pelo aumento do teor de amido total, como reflexo da concentração dos componentes do tubérculo.

Figura 24 – Atividade amilásica (a), concentração de açúcares redutores (b) e teor de amido total (c) de raízes de mandioquinha-salsa durante o período pós-colheita, sob diferentes condições de estocagem: à temperatura ambiente (25° C - ■-), a 25° C, sob acondicionamento a vácuo (---●---), e lavagem com hipoclorito (---▲---), a 4° C sem lavagem (---▼---), a 4°C, sob acondicionamento a vácuo (---◆---) e lavagem com hipoclorito (---▲---).

O perfil de atividade amilolítica para as raízes embaladas e não embaladas é um pouco diferente para cada uma destas situações, pois o pico de atividade enzimática ocorre no terceiro dia pós-colheita, para as raízes não embaladas, e no quinto dia, para as raízes acondicionadas a vácuo. A atividade amilolítica das raízes acondicionadas a vácuo apresentou as mesmas alterações até o quinto dia de armazenamento, tanto para as raízes armazenadas à temperatura ambiente quanto para as estocadas sob refrigeração doméstica (Figura 24a). Este comportamento também foi observado na quantificação de amido total e no teor de açúcares redutores, indicando, no caso da deterioração provocada por enzimas amilolíticas, que quando as raízes são embaladas a vácuo a temperatura de armazenamento não é um fator limitante (Figuras 24b e 24c). No entanto, devido ao alto grau de deterioração das raízes embaladas e armazenadas a 25° C, pode-se inferir que a ação de outro grupo de enzimas – no caso, as pectinolíticas – pode ser o principal fator de degradação das raízes.

O melhor resultado observado na conservação das raízes ocorreu a 4°C e sob acondicionamento a vácuo. Até o 11º dia de armazenamento as raízes ainda se mostravam aptas ao consumo, embora a atividade AM tenha apresentado um aumento substancial neste dia. Não foi observado o surgimento de manchas marrons na superfície, possivelmente devido ao fato da embalagem a vácuo ser uma barreira física para fungos e bolores, impedindo o crescimento destes microrganismos, majoritariamente aeróbios.

Em relação ao efeito dos tratamentos no terceiro dia de armazenamento na atividade AM, as raízes não armazenadas a vácuo e mantidas a 25 e a 4° C apresentaram-se estatisticamente iguais entre si e significativamente diferentes tanto das amostras armazenadas a vácuo a 25° C quanto das estocadas a 4° C, a vácuo ($p=0,005993$) (Ver Anexo 1 – Figura E). Para o teor de amido total, as raízes mantidas a 25° C, embaladas ou não a vácuo, apresentaram-se estatisticamente iguais e significativamente diferentes das raízes embaladas a vácuo e armazenadas a 4° C. ($p=0,009260$) (ver Anexo 1 – Figura F). Quanto ao teor de açúcares redutores, somente o armazenamento a 25° C, sem embalagem, mostrou-se significativamente diferente em relação aos outros tratamentos ($p=0,003676$) (ver Anexo 1 – Figura G), que se apresentaram semelhantes ($p>0,05$).

Takahata *et al.* (1995) e Hagenimana *et al.* (1994) também observaram um aumento na atividade amilásica, que correspondeu à diminuição do teor de amido

durante o armazenamento de batata doce. A atividade α -amilásica de inhame aumentou rapidamente após 36 h de armazenamento à temperatura ambiente. Entretanto, a baixas temperaturas de estocagem (4° C), a atividade das enzimas α - e β -amilases foi consideravelmente minimizada (Afoakwa & Sefa-Dedeh, 2002). Os resultados encontrados se assemelham aos que constam do presente trabalho.

Em kiwi, Bonghi *et al.* (1996) detectaram uma alta atividade amilolítica, que se reduziu progressivamente até o 15° dia pós colheita, aumentando novamente até o 33° dia e diminuindo outra vez no 40° dia, quando o armazenamento ocorreu a 20°C. A conversão do amido representa um dos aspectos metabólicos mais importantes da fruta, onde o teor de amido passa de 5-7% (base úmida) após a colheita, a traços detectáveis no final do período de estocagem e o teor de açúcares redutores aumenta em até 12-15%.

As alterações nos teores de amido de raízes de inhame são bastante afetadas pelo tempo e pela temperatura de armazenagem. Afoakwa & Sefa-Dedeh (2001) documentaram a diminuição dos teores de amido de dois cultivares de inhame 72 h pós-colheita. As taxas de diminuição dos teores de amido foram maiores nas raízes armazenadas a 28° C, quando comparadas às armazenadas a 4° C. Os autores também verificaram um aumento no teor de açúcares redutores conforme a extensão do tempo de estocagem. Eles sugerem que a hidrólise do amido e a formação de açúcares redutores sejam consequência da hidrólise enzimática, que ocorre após a colheita das raízes. A diminuição do teor de amido e um aumento na concentração de açúcares redutores durante o armazenamento de inhame também foram reportados por Trèche e Agbor-Egbe (1996), quando as raízes foram estocadas à temperatura ambiente, por cinco dias. O teor de amido variou de 86 a 82 g / 100 g (base seca), enquanto o teor de açúcares redutores variou de 0,9 a 1,6 g / 100 g (base seca). Em batata doce, armazenada à 20° C, o teor de amido reduziu 10%, em média, em seis meses de armazenamento. A atividade amilásica apresentou um pico no segundo mês de estocagem, com um pequeno aumento no teor de açúcares redutores (Zhang *et al.*, 2002).

Em termos de vida-de-prateleira, as raízes de inhame e batata doce são mais resistentes que as da mandioquinha. O inhame pode ser armazenado a temperaturas entre 20 e 28° C por 29 semanas (em torno de 7 meses). Durante o período de estocagem foi observada uma baixa atividade enzimática nas primeiras

nove semanas, que aumentou substancialmente em seguida, quando o teor de amido foi reduzido gradativamente. Os autores sugerem que a baixa atividade amilolítica neste período inicial decorreu do estágio de dormência do tubérculo (Ikediobi & Oti, 1983), o que poderá responder pelo longo período de vida-de-prateleira do tubérculo. Este estado não é observado na mandioquinha. Assim como o inhame, a batata doce também é uma cultura resistente. Quando armazenada a 20° C, com umidade relativa controlada (75%), a batata doce pode ser estocada por 3 meses.

4.6 – Perda de peso das raízes durante o período de armazenamento

A Figura 25 representa a perda de peso (água) das raízes tuberosas de mandioquinha, armazenadas em estufa a 25° C e em refrigerador doméstico (4°C).

Figura 25 – Perda de peso (%) de raízes de mandioquinha-salsa durante o período pós-colheita, sob diferentes condições de estocagem: à temperatura ambiente (25°C - ■-) e a 4° C (---▼---), sem embalagem. As barras de erro representam o desvio padrão de oito amostras independentes.

A perda de peso das raízes foi mais acentuada quando o armazenamento ocorreu à temperatura de 25° C, chegando a 16,24% no 4º dia pós-colheita. Para as raízes armazenadas a 4° C, a perda de água atingiu este mesmo patamar (16,75%) somente no 11º dia de armazenamento (Figura 25).

Em carambolas, foi observada uma perda de água de 20% ao final do período de três semanas de estocagem à 20° C. O armazenamento da fruta a 10°C reduziu significativamente a perda de água, que chegou a ser inferior a 5% neste mesmo período (Ali *et al.*, 2004). Em abacates e sapote mamey, estocados à 20° C, a perda de peso foi de 7% e de 5,4%, respectivamente, após 8 e 7 dias de armazenamento (Jeong *et al.*, 2002; Ergun *et al.*, 2005). Em todos os trabalhos citados, o tratamento com 1-MCP (1-metil-ciclo-propano), que bloqueia a percepção do etileno, reduziu a taxa de respiração dos frutos.

Embora Avelar-Filho (1989) tenha identificado a taxa de respiração da mandioquinha como variando de baixa a moderada e, portanto, não a qualificaria como um fator relevante no processo de elevada degradação da raiz, estudos complementares para a determinação da taxa de produção de etileno e medida da produção de CO₂ seriam interessantes no sentido de se melhorar o entendimento das vias metabólicas das raízes, uma vez que a redução de sua taxa de respiração levaria a uma conseqüente extensão de vida pós-colheita da planta.

Nos ensaios relacionados às alterações ocorridas durante o período de estocagem das raízes, foram utilizados somente os resultados do último experimento (4º lote de raízes) em razão da heterogeneidade dos períodos de colheita (meses do ano, clima etc). O último experimento foi realizado com maior cautela, abrangendo todos os ensaios que, em alguns casos anteriores, haviam sido realizados somente em lotes diferentes. Além disso, o primeiro lote apresentou resultados bem distintos dos posteriores, uma vez que as raízes colhidas não foram lavadas antes do início do experimento, por sugestão do agricultor. De fato, as raízes se mantiveram íntegras por muito mais tempo. No entanto, esta não seria uma situação simuladora da realidade, pois dificilmente são encontrados no varejo alimentos que não foram objeto de higienização prévia.

O segundo lote foi obtido no final de maio – o clima mais seco e frio também favoreceu o aumento de vida-de-prateleira das raízes, ao contrário do que ocorreu no terceiro lote, onde as raízes foram colhidas em outubro. A falta de homogeneidade dos lotes em relação às raízes armazenadas à “temperatura ambiente” levou o armazenamento do 4º lote em estufa com temperatura controlada, a 25° C. Embora não seja o ideal (já que ocorrem variações de temperatura ao longo do dia quando o armazenamento é feito, de fato, a temperatura ambiente, contrastando com a manutenção da temperatura na estufa), é uma forma de controle para que as amostras fossem tratadas de forma homogênea.

Villavicencio *et al.* (2004) verificaram que a atividade PE e PG é afetada por diferenças nas condições ambientais durante o período de colheita de batata-doce. Foram feitas determinações de atividade enzimática nos anos de 1999 e 2000, onde foi detectado que, em 1999, ano no qual foram registradas diversas tempestades tropicais que resultaram em 1027 mm de chuva durante o período de crescimento, contra os 569 mm durante o mesmo período em 2000. No mês anterior à colheita, foram detectados 190,5 mm de chuva em 1999, contra 67,56mm em 2000. Em abacates, a síntese de isoformas de PG está diretamente relacionada ao nível de oxigênio (Kanellis *et al.*, 1992), assim como a PE de banana, o baixo nível de oxigênio diminuiu a atividade enzimática (Kanellis *et al.*, 1988). O nível de oxigênio das raízes, indiretamente determinado através do teor de umidade do solo, pode apresentar efeitos na atividade enzimática.

O armazenamento das raízes a 4° C, sob acondicionamento a vácuo, mostrou-se o mais eficiente para fins de prolongamento da vida de prateleira das raízes. A temperatura baixa reduz a taxa de respiração – e, conseqüentemente, a perda de água – e não favorece o crescimento microbiano. Considerando o fato das bactérias causadoras de podridão-mole serem provenientes do solo e estarem “naturalmente” presentes nas raízes, a lavagem com hipoclorito não foi suficiente para a redução da carga microbiana. Uma alternativa para se prolongar a vida pós-colheita da mandioquinha seria a irradiação das raízes embaladas a vácuo, eliminando a ação da bactéria na planta. Em relação à alta taxa de perda de água das raízes, estudos complementares são necessários para o entendimento das vias fisiológicas das raízes.

Por outro lado, o acondicionamento a vácuo reduz a concentração de oxigênio, que reflete numa progressiva inibição da taxa de respiração da planta

(Geigenberger, 2003). Em um estudo com batatas, rodela do tubérculo foram incubadas em diferentes concentrações de oxigênio, por duas horas. A diminuição da concentração de oxigênio de 40% a 1% resultou numa constante diminuição da energia celular, fluxo glicolítico e taxa de respiração (Geigenberger, 2000). A diminuição da taxa de respiração das raízes de mandioquinha em função do acondicionamento a vácuo como consequência de uma menor disponibilidade de oxigênio, pode ter contribuído para o aumento de vida-de-prateleira das raízes armazenadas sob estas condições.

Em baixas concentrações de oxigênio, a atividade enzimática da planta também pode ser comprometida, como discutido anteriormente. Isso ocorre, também, para as raízes embaladas a vácuo, que apresentaram diminuição da atividade PG (Figura 14b). Um comportamento semelhante foi observado para a atividade PG de tomates onde, em baixas concentrações de oxigênio, a atividade da enzima não foi detectada enquanto na presença de ar, a atividade enzimática aumentou gradativamente durante o período de 3 semanas de estocagem a 20°C. A diminuição da temperatura de estocagem para 10°C também provocou uma redução na atividade da enzima (Kapotis *et al.*, 2004).

4.7 – Microscopia eletrônica de varredura do amido de mandioquinha extraído em diferentes estágios de deterioração da planta

As características morfológicas de amidos de diferentes fontes variam com o genótipo e com práticas culturais. As variações de tamanho e forma dos grânulos de amido são atribuídas à origem biológica da planta. A morfologia do grânulo de amido depende da bioquímica do cloroplasto ou amiloplasto, assim como da fisiologia da planta. O tamanho do grânulo de amido pode variar de 1 a 110 μm , sendo considerados pequenos os grânulos de tamanho entre 1 e 20 μm e grandes os que variam entre 20 e 110 μm (Singh *et al.*, 2003).

A Figura 26 mostra a microscopia eletrônica de varredura do amido de mandioquinha extraído em diferentes períodos de armazenamento: 1º dia pós-colheita (Figuras 26A e 26B), 9º dia pós-colheita, sob armazenamento a temperatura ambiente (Figuras 26C e 26D) e 9º dia pós-colheita, à 4º C (Figuras 26E e 26F).

Figura 26 – Micrografia eletrônica de varredura do grânulo de amido de mandioca extraído em diferentes períodos de armazenamento: 1º dia pós-colheita (A e B), 9º dia pós-colheita, à temperatura ambiente (C e D) e 9º dia pós-colheita, à temperatura de refrigeração (E e F).

Os grânulos do amido de mandioca possuem formato elipsóide e são truncados, apresentando tamanho pequeno (inferior a 20 μm). Apresenta poros na região equatorial, com um diâmetro estimado de 2 μm . Santacruz *et al.* (2002) também observaram a presença de poros no amido de mandioca e com tamanhos dos grânulos similares ao do presente trabalho, variando de 7 a 23 μm . Outros autores apresentaram resultados semelhantes, sendo que o tamanho do amido de mandioca variou de 4 a 26 μm (Cereda, 2001; Pérez *et al.*, 1999). Em geral, os grânulos de amido de cereais, como os de milho e arroz, também são pequenos, variando de 1 a 20 μm e de 3 a 5 μm de tamanho, respectivamente. As propriedades físico-químicas tais como o teor de amilose, capacidade de entumescimento e de retenção de água estão diretamente relacionadas ao tamanho dos grânulos de amido de diferentes fontes (Singh *et al.*, 2003).

A Tabela 11 representa a média e desvio padrão do tamanho dos grânulos de amido durante o período de armazenamento das raízes. Os maiores valores foram encontrados no 9º dia de estocagem, à 4º C, enquanto o menor tamanho foi verificado quando as raízes foram estocadas à temperatura ambiente, por 9 dias.

Tabela 11 – Variação do tamanho dos grânulos de amido de mandioquinha observados em microscopia eletrônica de varredura durante o período de estocagem das raízes. Os valores representam a média e o desvio dos tamanhos dos grânulos.

Período e forma de armazenamento	Tamanho (μm)
1º dia pós-colheita	14,90 $\pm$ 3,76
9º dia pós-colheita, à 25º C	11,36 $\pm$ 5,46
9º dia pós-colheita, à 4º C	16,42 $\pm$ 4,76

Embora o objetivo principal deste experimento tenha sido o de verificar a hidrólise enzimática ao longo do período de armazenamento, a dificuldade em se discutir esta degradação se dá ao fato de, já no primeiro dia pós-colheita, alguns grânulos apresentarem-se com características semelhantes às de degradação. A presença de canais na superfície do amido pode ser, também, em função da quebra ou colapso do amido durante o processo de extração. Portanto, pode-se dizer que a presença desses canais ou a diminuição do tamanho do grânulo do amido podem ocorrer não só em função da ação de enzimas amilolíticas como também como consequência do colapso dos grânulos de amido durante o preparo da amostra. Zhang & Oats (1999) reportaram a presença de poros ou canais nos grânulos do amido de batata doce por microscopia eletrônica de varredura como consequência do ataque de α -amilase, assim como Sarikaya *et al.* (2000) apresentaram como resultado da ação de α - e β -amilases a presença de poros e colapsos em grânulos de amido de batata, batata doce, arroz, trigo e milho. Embora estes autores considerem estas quebras como resultado da ação enzimática, seria necessário avaliar vários campos de amostra de grânulos de amido de mandioquinha por microscopia eletrônica de varredura para reforçar a idéia da hidrólise enzimática nestes pontos, no interior dos tecidos.

5. CONCLUSÕES

Face aos resultados obtidos no presente trabalho, é possível concluir que:

1. as melhores condições de extração de pectinesterase e poligalacturonase de raízes de mandioquinha ocorreram a pH 7,5 e 4,0, respectivamente, sendo consideradas não-significativas as variáveis tempo de extração e concentração de NaCl do extrato enzimático pelo modelo estatístico MSR, dentro do intervalo estudado;
2. a ação de enzimas pectinolíticas está relacionada à deterioração das raízes de mandioquinha durante o armazenamento. O aumento da atividade PE e PG das raízes acondicionadas a vácuo e armazenadas à 25° C sugere a contaminação das raízes por bactérias causadoras de podridão-mole;
3. a melhor forma de conservação das raízes ocorreu à temperatura de refrigeração, sob acondicionamento a vácuo, onde foi observado uma diferença significativa em relação à atividade AM, teor de amido total e atividade PE;
4. as raízes apresentaram alta atividade pectato-liásica durante o armazenamento, com o mesmo perfil de atividade para as diferentes formas de estocagem – exceto para as raízes embaladas a vácuo, armazenadas à 25° C, que apresentaram um pico de atividade no 4° dia de armazenamento. A atividade deste grupo de enzimas pode estar relacionada à deterioração das raízes;
5. a atividade celulásica foi praticamente nula durante o armazenamento das raízes, indicando que esta enzima não representa um papel importante na degradação da mandioquinha;
6. a atividade amilolítica representa um importante papel na deterioração das raízes, uma vez que a conversão do amido a açúcares redutores representa um dos aspectos metabólicos mais importantes de um tubérculo rico em amido;
7. devido à produção de gás e à alta atividade pectinolítica, a deterioração das raízes de mandioquinha parece estar associada não só à presença de enzimas endógenas, mas também à de bactérias responsáveis pela podridão-mole; o conhecimento das vias de deterioração das raízes pode reduzir as perdas pós-colheita;

8. estudos complementares são necessários para o entendimento das vias metabólicas das raízes, que apresentaram alta perda de peso durante o armazenamento;
9. os grânulos de amido de mandioquinha têm formato elipsóide e apresentam poros em sua região equatorial, como já reportado na literatura. A hidrólise do amido via ação enzimática é difícil de ser caracterizada devido à presença de grânulos com canais em sua superfície, que podem ser artefatos de técnica durante o processo de extração do amido.

Capítulo 2

Isolamento e identificação de *Erwinia carotovora* em raízes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.)

Capítulo 2 – Isolamento e identificação de *Erwinia carotovora* em raízes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.)

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 – Podridão-mole em raízes e tubérculos

A podridão-mole é a doença mais importante na mandioquinha-salsa, pois responde por grandes perdas durante o transporte, o armazenamento e a comercialização das raízes (Lopes & Henz, 1997). O primeiro relato da ocorrência de *Erwinia* em raízes de mandioquinha foi feito em Burton (EUA), no ano de 1970. Posteriormente, em 1972, Cármino & Diaz Polano identificaram a *Erwinia amylovora* como responsável pela doença em raízes de mandioquinha na Venezuela (Henz, 2002).

No Brasil, a podridão-mole foi primeiramente relatada no campo por Romeiro *et al.* (1988) como uma doença causada por *Erwinia carotovora*, observada no estado de Minas Gerais. No Distrito Federal, outras espécies do gênero também foram identificadas como agentes da doença: *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica* e *E. chrysanthemi* (Henz *et al.*, 1992). Mas a primeira destas subespécies é encontrada com maior frequência em raízes de mandioquinha-salsa no Brasil (Henz, 2002).

As espécies bacterianas que atacam a cultura no campo são as mesmas que respondem pela doença no período pós-colheita. Quando colhidas, as raízes já estão contaminadas com o patógeno, que inicia o processo infeccioso a partir de ferimentos ocorridos durante a colheita, lavagem e transporte. O principal aspecto epidemiológico da doença é a lavagem das raízes, exigida para a comercialização do produto. Além de ferir a superfície das raízes, ela fornece água livre, determinante para a infecção, multiplicação e disseminação do patógeno. O sintoma da doença pode aparecer em dois dias após a colheita, com o surgimento de pequenas lesões úmidas, muitas vezes encharcadas e escorregadias ao tato, que aumentam em tamanho e profundidade, quanto mais quente e úmido for o ambiente

de armazenamento, exalando um odor desagradável e característico. Em raízes de mandioquinha, os sintomas de podridão-mole foram observados no campo e se acentuam durante o armazenamento (Lopes & Henz, 1997; Romeiro *et al.*, 1988).

A podridão-mole é provocada por bactérias de três gêneros: *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Clostridium*. É uma das infecções mais comuns e mais sérias que ocorre na maioria das frutas e vegetais, tanto no campo quanto após a colheita, durante a etapa de estocagem. Essas bactérias não contaminam diretamente as plantas saudáveis e intactas; o acesso ocorre devido a danos sofridos durante a colheita e o manuseio, ou mesmo devido a lesões provocadas pela contaminação de fungos e de outros tipos de bactérias (Bartz & Eckert, 1987). Existem relatos da presença de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* em diferentes ambientes e animais, incluindo insetos, plantas, solo, neve, superfície de água fresca e até mesmo no mar. As exoenzimas são o primeiro fator de virulência provocado por *Erwinias* pectinolíticas (De Boer, 2003).

Sob condições de temperatura ambiente, a podridão-mole é primeiramente provocada por duas de cinco subespécies de *Erwinia carotovora*: a *E. carotovora* subsp. *carotovora* é considerada um hospedeiro comum, enquanto a *E. carotovora* subsp. *atroseptica* é mais especificamente associada à batata e prevalece em condições de temperatura mais baixas, próprias de climas temperados. Ambas as subespécies acarretam perdas severas na plantação e durante a estocagem de tubérculos (Hélias *et al.*, 1998).

As pectato liases estão envolvidas com doenças relacionadas ao amolecimento de tecidos vegetais. A *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) e a *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) são coliformes patogênicos ocorrentes em batata. Imediatamente após a infestação no tecido da planta, estas bactérias produzem grande quantidade de enzimas pécticas extracelulares, sendo o fator mais virulento a produção de pectato liase (Wegener, 2002). A Eca tende a crescer em temperaturas superiores à 25°C. A não-patogeneicidade de Ecc é normalmente atribuída à sua incapacidade de competição com a Eca e com outras bactérias saprofíticas, comumente presentes em tubérculos. Entretanto, ocasionalmente, quando a Ecc prevalece na planta, esta é a principal responsável pelo amolecimento (Pérombelom, 2002; Darrasse *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1994).

A infecção latente dos tubérculos por podridão-mole é comum à maioria das raízes obtidas comercialmente, e as observações variam da contagem de colônias

não-detectáveis ($<10^1$ células/g de tecido) a 10^6 células/g de tecido contaminado (Pérombelom, 2002). A bactéria fica localizada entre as células, na leticela e no ferimento, e normalmente se estendem além da camada da feloderme e, possivelmente e em menor extensão, no sistema vascular (xilema). Apesar de essencial para a mobilidade da bactéria flagelada e para a sua multiplicação, é improvável que exista uma mono-camada de água na parede celular e água livre remanescente nos espaços intercelulares. As células da planta geralmente sofrem de déficit de água (alto potencial osmótico), que, durante o dia, varia nos tubérculos de 5 à 8 bar, conforme seja o balanço entre a perda e o ganho de água, cujos resultados afetam a turgidez da planta (Pérombelom, 2002). A contaminação da planta pode ocorrer antes, durante ou após a colheita, sendo inúmeras as fontes de inoculação já identificadas. O microrganismo pode estar presente no solo onde foi realizado o plantio ou a contaminação pode provir de algum equipamento utilizado na colheita (Toth *et al.*, 2003).

As células de *Erwinia* no tecido do tubérculo permanecem em estado de dormência, mesmo quando um número elevado de células (acima de 10^6 células/g de tecido) está presente. Isso ocorre, por exemplo, quando as raízes são inoculadas por infiltração a vácuo, em uma suspensão de bactérias. Após a adsorção da água livre, as bactérias entram em contato direto com a parede hidratada da célula cortical viva. O número de bactérias pode flutuar, conforme as condições de estocagem, aumentam na presença de umidade e diminuem em ambientes mais secos. Entretanto, este número não costuma exceder o nível crítico, no qual ocorre a maceração do tecido ($\sim 10^7$ células/g tecido infectado), exceto em tubérculos mantidos em determinadas condições por um tempo que favoreça a multiplicação bacteriana interrupta. A natureza da dormência ainda não é clara. No entanto, deve-se enfatizar que outras bactérias saprófitas pectinolíticas também são comumente encontradas em tubérculos (*Bacillus*, spp., *Clostridium* spp., *Flavobacterium* spp. e *Pseudomonas* spp.) que são microrganismos oportunistas, e também podem causar a doença. Uma possível explicação para o estado de dormência é o baixo nível de nutrientes e/ou, mais provavelmente, uma baixa atividade de água (a_w), que restringe o crescimento da bactéria. Neste caso, estaria implícito que a bactéria seria incapaz de utilizar os nutrientes suficientes ao seu crescimento, possivelmente como resultado da interação de outros hospedeiros, que podem ser de natureza ativa ou passiva. A bactéria, no entanto, pode sobreviver durante muitos meses, tempo

suficiente para infectar uma plantação de uma estação para outra (Pérombelom, 2002). Apesar de os agentes de infecção estarem naturalmente presentes em vegetais colhidos, as injúrias causadas pelo manuseio, aquecimento, calor, frio ou queimadura solar, aumentam consideravelmente o potencial de infecção das bactérias responsáveis pela podridão-mole. O tipo e a severidade da injúria influenciam diretamente o grau da doença. Batatas colhidas em solo quente ($>20^{\circ}\text{C}$) apresentam maior potencial para desenvolver podridão-mole em relação às outras, assim como batatas colhidas antes da época ("batatas novas") (Bartz & Eckert, 1987). DE BOER (2003) identificou a presença de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* em batatas, que não apresentaram a manifestação de podridão-mole, considerando a bactéria como membro da microflora da planta.

Para que a multiplicação das *Erwinias* ocorra no tecido do tubérculo, é imprescindível a presença de água disponível no sistema. Após a colheita, os vegetais devem ser secos, considerando-se que a água livre favorece a multiplicação microbiana e, conseqüentemente, a infecção do tecido. Foi detectado que batatas "chips" (secas) são relativamente imunes ao ataque dessas bactérias, quando embaladas a vácuo. Raízes de batatas incubadas com 10^8 UFC de *E. carotovora* se apresentaram extremamente resistentes à doença, quando incubadas na presença de ar, mesmo em umidade e temperatura favoráveis ao seu desenvolvimento. No entanto, sob condições de anaerobiose, a doença se desenvolveu, alastrando-se por toda a planta durante os cinco dias de observação (Bartz & Eckert, 1987).

Por si só, a anaerobiose não provocará a quebra do estado de latência ou o amolecimento do tecido. Tem sido demonstrado que a disponibilidade de água também induz o intumescimento e a quebra da estrutura do floema. Além disso, a anaerobiose aumenta a permeabilidade da membrana celular, o que acarreta a perda de conteúdo celular. Como resultado, a bactéria pode penetrar fundo no tecido, multiplicar-se, e produzir enzimas que degenerem a parede celular. As perdas celulares subseqüentes, seguidas de degradação enzimática, podem levar as células a uma ruptura e a pressão osmótica a diminuir, aumentando a disponibilidade de nutrientes. Um outro efeito da anaerobiose pode ser o aumento da virulência da bactéria. Apesar da sua taxa de crescimento *in vitro*, em um meio de cultura rico em pectato sob condições de anaerobiose, ser de duas a três vezes mais lenta que em condições de aerobiose, a produção de enzimas pécnicas por célula de

bactéria, em particular a pectato liase, é normalmente o dobro da produção em condições de aerobiose (Pérombelom, 2002).

As *Erwinias* responsáveis pela podridão-mole tendem a crescer 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 (ponto isoelétrico ácido ou básico, alto ou baixo pH ótimo, endo- ou extracelular) e modo de ação endo- ou exo-. A habilidade de produzir uma grande variedade de enzimas/isoenzimas mais rapidamente e em maior quantidade que os microrganismos saprófitas pectinolíticos torna a *Erwinia* apta a infectar plantas com mais eficiência. Em relação às enzimas produzidas pela bactéria, as pectinases são consideradas as mais importantes em patogeneicidade, 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 produzidas: a pectato liase, a pectina liase e a pectinametilesterase, que apresentam um pH ótimo em torno de 8,0, e a poligalacturonase, com pH ótimo de atividade enzimática em torno de 6,0 (Pérombelon, 2002; Walker *et al.*, 1994). A produção destas enzimas é o fator de virulência primário provocado por *Erwinias* pectinolíticas (De Boer, 2003).

2. OBJETIVOS

Isolar e identificar, por meio de testes bioquímicos e fisiológicos, o microrganismo que possa responder (ao menos em parte), pela degradação sofrida pela mandioquinha-salsa, durante o período de armazenamento das raízes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – MATERIAIS

Material vegetal

Para o isolamento da bactéria, as raízes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Cv. *Amarela Comum*), fornecidas pelo CEAGESP um dia pós-colheita, foram armazenadas em estufa (25° C) e embalagem a vácuo, durante cinco dias ou até apresentarem sintomas típicos de podridão-mole, tais como a produção de gás e maceração excessiva do tecido.

As amostras foram embaladas pelo próprio fornecedor das raízes, em filmes de nylon-polietileno com face metalizada (Gabrilina®) e com uma pressão de vácuo de 70 mmHg.

Reagentes

Todos os outros reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico.

3.2 – MÉTODOS

3.2.1 – Isolamento de bactéria de raízes de mandioquinha-salsa

Para o isolamento da bactéria das raízes de mandioquinha, foram criadas condições que favorecessem o crescimento da bactéria, tais como anaerobiose e incubação das raízes em temperatura ótima de crescimento bacteriano (25° C), já citados no item 3.1. Para tanto, três raízes embaladas a vácuo foram incubadas a 25° C, por 5 dias. O isolamento da bactéria foi feito diretamente do tubérculo, envolvendo as partes infectadas (amolecimento excessivo, com produção de gás), pela utilização de uma alça estéril. Após o estriamento, as bactérias cresceram em meio 523 (sacarose, 10,0 g; caseína ácida hidrolisada, 8,0 g; extrato de levedura, 4,0 g; K₂HPO₄, 2,0 g; MgSO₄.7H₂O, 0,3 g; ágar, 15,0 g; água destilada, 1L) (Romeiro *et al.*, 1988), específico para o gênero *Erwinia*, por 24 h, a 25° C, em aerobiose, pois a bactéria é anaeróbia facultativa.

As colônias isoladas foram repicadas em caldo (meio 523). Após 24 h de incubação a 25°C, as colônias foram repicadas em meio TSA (Difco) e armazenadas em geladeira até a sua utilização.

3.2.2 – Identificação do microrganismo isolado através de testes bioquímicos e fisiológicos

Os testes bioquímicos foram realizados de acordo com os métodos descritos por Shaad *et al.* (2001), com o objetivo de identificar o gênero da bactéria: crescimento em meio de cultura específico, forma da célula e coloração de gram, metabolismo de diferentes fontes de carbono (fermentativo ou oxidativo), crescimento em anaerobiose e em meio YDC (extrato de levedura, 10,0 g; dextrose, 20,0 g; CaCO₃, 20,0 g; agar, 15,0 g; água destilada, 1L) . Os resultados foram então comparados com as características para o gênero da bactéria patogênica de planta (Kreig, 1984).

A determinação das espécies e subespécies foi baseada na reação aos seguintes testes: atividade pectinolítica, crescimento rápido em ágar nutriente (AN) (Difco) em diferentes temperaturas (10, 15, 25, 30 e 37° C), crescimento na presença de NaCl (5 e 10%), atividade fosfatásica, sensibilidade a eritromicina, utilização de fontes de carbono (Tabela 1) (Shaad *et al.*, 2001). Outros testes bioquímicos foram realizados através do sistema de identificação API 20E (BioMérieux). Os resultados obtidos foram comparados com dados da literatura (Kreig, 1984).

3.2.3 – Identificação do microrganismo isolado através de técnica de PCR

Após o crescimento das células bacterianas em caldo TSB por 24h à 25° C, a extração do DNA do microrganismo isolado foi feita através da utilização do kit de extração de DNA de bactérias Gram-negativas (Amersham BioSciences – Product code: 27-5237-01). A diluição do DNA extraído foi feita para a obtenção de uma concentração de DNA de 5 ng/mL.

O PCR foi realizado em termociclador 2400 Perkin Elmer, utilizando os oligonucleotídeos sintéticos (primers) Y₁ (5'-GCACGTATGATGAGCCAGG-3') e Y₂ (5'-GGAATTCAGCCTGTTTGAAC-3'), específicos para *Erwinia carotovora* e

selecionados a partir do gene codificado de recombinase A, para a amplificação de um segmento de 280pb. A bactéria utilizada como padrão (*Erwinia carotovora*) foi fornecida pela EMBRAPA. A amplificação do gene ocorreu com 50µL de solução final de PCR, contendo: 20µL de Master Mix (taqpolimerase, tampão e DNTp), 1,3µL de cada primer, 1,0µL de Mg^{+2} (cofator da taqpolimerase), 3,0µL do DNA isolado e 23,4µL de água MilliQ autoclavada. As condições de amplificação foram as seguintes: o DNA foi desnaturado a 94° C por 3 min, seguido de 32 ciclos de desnaturação a 94° C por 45 seg, hibridização a 57° C por 90 seg e polimerização à 72° C por 120 seg. Após único ciclo final de 72° C por 7 min e abaixamento da temperatura a 4° C, alíquotas de 3µL do produto de PCR foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1,0% contendo 1µL de brometo de etídio (Hélias *et al.*, 1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Identificação de espécie bacteriana em mandioquinha

A bactéria causadora de podridão-mole foi facilmente isolada de raízes de mandioquinha, sendo obtidos dois isolados. Em meio 523, as colônias apresentaram-se brancas, opacas, não fluorescentes e elevadas. Através do microscópio óptico, verificou-se que ambos os isolados estudados são cocos gram-negativos. A bactéria é móvel, anaeróbia facultativa, catalase positiva e oxidase negativa. Segundo Hyman *et al.* (1998), citado por De Boer & Kelman (2001), bactérias pectinolíticas são confirmadas como sendo do gênero *Erwinia* através da detecção de testes de catalase (positivo), oxidase (negativo), que apresentam metabolismo anaeróbio facultativo. Em meio YDC, não foi verificada a presença de pigmento amarelo ou rosa. De acordo com critérios fisiológicos e bioquímicos, o microrganismo foi identificado como *Erwinia* pectinolítica.

Os testes bioquímicos e fisiológicos para a diferenciação das subespécies pectinolíticas forneceram os resultados apresentados na Tabela 1. Os resultados apontam para a identificação de *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera*.

Para a identificação de subespécies de *Erwinias* pectinolíticas, Hélias *et al.* (1998) realizaram testes de acidificação da lactose, melibiose, sorbitol e arabitól, produção de indol, alcalinização do citrato, crescimento a 37° C e produção de substâncias reduzidas a partir da hidrólise da sacarose.

A taxonomia de *Erwinias* causadoras de podridão-mole ainda está em fluxo. Recentemente, a nomenclatura *Pectobacterium* foi proposta, mas a maioria da comunidade de pesquisadores de *Erwinia* não aceitou a nomenclatura uma vez que os dados apresentados por Hauber *et al.* (1998) eram muito vagos para sustentar a transferência da *Erwinia* pectinolítica para um novo gênero (Yap *et al.*, 2004). Entretanto, são encontrados na literatura trabalhos onde a nomenclatura *Pectobacterium* substitui a *Erwinia* (Kang *et al.*, 2003; Henz *et al.*, 2005). No presente trabalho, foram utilizados os nomes originais.

Tabela 1 – Testes bioquímicos e fisiológicos para a identificação de *Erwinias* pectinolíticas¹ (Shaad *et al.*, 2001).

Teste	Isolado	<i>Ecc</i>	<i>Eca</i>	<i>Eco</i>	<i>Ech</i>
Coloração de gram	-	-	-	-	-
Motilidade	Móvel	Móvel	Móvel	Móvel	Móvel
Crescimento à					
10° C	-	-	+		-
15° C	+				
25° C	+	+	+		+
30° C	+	+	+		+
37° C	+	+	-	+	+
Crescimento em					
NaCl 5%	+	+	+		+
NaCl 10%	-	+	+		+
Anaeróbio facultativo	+	+	+	+	+
Produção de gás a partir de D-glicose	+	+	+	+	+
Atividade pectinolítica/ maceração do tecido	+	+	+	+	+
Atividade fosfatásica	-	-	-	-	+
Sensibilidade à eritromicina	-	-	-	ND	+
Produção de ácido a partir de D-glicose (*)	+	+	+	+	+
Urease	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	+
Citrato	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-
Produção de pigmento em meio YDC	-	-	-	-	-
Redução de nitrato a nitrito (*)	+	+	+	+	+
Produção de ácido a partir de:					
Adonitol	+				
Amidalina (*)	+				
L-arabinose	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	-
Esculina	+				
Inositol (*)	-				
Lactose (*)	+	+	+	+	+
Maltose	+				
Manitol (*)	+	+			
Manose	+				
Melobiose (*)	+	+	+	+	+
Rafinose (*)	+	+	+	ND	+
Ramnose	+	+			
Sacarose (*)	+	+	+	+	+
Salicina	+	+			
Sorbitol (*)	+	-	-	+	-
Trealose	+	+	+	+	-
D-xilose	+	+			

ND, não determinado; (*) API 20E;

¹Ecc = *E. carotovora* subesp. *carotovora*; Eca = *E. carotovora* subesp. *atroseptica*; Eco = *E. carotovora* subesp. *odorifera*; Ech = *E. chrysanthemi*

A atividade das enzimas pectinolíticas pode ser um fator limitante na degradação das raízes. A possibilidade de que o efeito-degradação destas enzimas, que atuam na parede celular do vegetal, provenha de microrganismos, conduziu à hipótese de que a principal causa de deterioração das raízes fosse originária de uma fonte externa, como a contaminação microbiana, causada por *Erwinia* (podridão-mole). Imediatamente após a invasão do tecido, a bactéria começa a produzir uma grande quantidade de enzimas que degradam a parede celular, sendo o maior fator de virulência a produção de pectato liase (Wegener, 2002). A determinação da atividade pectato liásica nas raízes, em todos os estágios de armazenamento, é um forte indício de infecção da planta. Neste caso, as enzimas pectinolíticas endógenas, podem atuar no processo deteriorativo da planta, embora não sejam as principais responsáveis por seu curto período de estocagem.

No capítulo anterior, foram descritas as atividades das enzimas pectinolíticas. A ação da pectato liase em função das condições de armazenamento das amostras (Figura 21) mostra o rápido incremento de atividade da PL em temperaturas de 25°C (0 a 6U), sobretudo se embaladas a vácuo (0 a 10 U, aproximadamente) no 4º dia pós-colheita. Nas condições de refrigeração, as amostras também apresentaram aumento de atividade PL, de 0 a 4 U, desde o 3º dia pós-colheita, permanecendo estáveis ou com ligeiro declínio até o final do experimento, no 11º dia.

Um estudo piloto foi realizado no LEA (Laboratório de Engenharia de Alimentos) do Departamento de Engenharia Química (POLI/USP), 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 por observação visual. Os resultados mostraram que, quando as raízes foram irradiadas em doses baixas (0,10 kGy) ou muito altas (10,0 kGy), o efeito da irradiação não foi observado ou apresentou um alto grau de deterioração das raízes, respectivamente. A 0,1 kGy as raízes não apresentaram diferença de comportamento em relação ao grupo controle de raízes não irradiadas, enquanto que, a 10,0 kGy, as raízes apresentaram-se amarronzadas e com textura similar a 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 para a eliminação de formas biológicas de contaminação. Para a comprovação desta hipótese, outros trabalhos deveriam ser realizados com esta finalidade, onde a eficácia da irradiação poderia ser medida através da quantificação da atividade enzimática, do monitoramento do crescimento microbiano e acompanhado de análise sensorial do material irradiado, pois esta última faz a avaliação dos atributos de qualidade de produtos que sofreram irradiação.

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. A contagem microbiana, que visou identificar a presença de fungos e leveduras, mostrou que as amostras irradiadas mantiveram-se em níveis aceitáveis de consumo até o 14º dia de armazenamento, superando as amostras não-irradiadas, que neste período apresentaram um alto grau de deterioração (lemma, 2001). Neste trabalho desenvolvido no CENA, a contagem microbiana foi feita somente para o crescimento de bolores e leveduras e não para contagem total de bactérias.

As raízes de mandioquinha passam por um processo de lavagem no dia da colheita. Uma quantidade equivalente a 30 kg de raízes é colocada em uma rede basculante cujas extremidades são fixadas em lados opostos (que pode ser feito de forma semi-manual ou mecanizada, dependendo da reação). Após o mergulho no tanque, a rede oscila no sentido longitudinal permitindo a lavagem das raízes por atrito entre elas. Nesta fase, a água, além de remover os resíduos de terra, penetra nas raízes veiculando os contaminantes (Henz *et al.*, 2001). Por esta razão, a conservação das raízes tuberosas de *A. xanthorrhiza* é menos eficiente em raízes higienizadas do que em raízes não lavadas. Do mesmo modo, as raízes que foram mais uma vez mergulhadas em hipoclorito apresentaram maior degradação e produção de gás do que as raízes submetidas ao tratamento convencional (Figuras 19 e 21).

4.2 – Identificação do microrganismo isolado através de técnica de PCR

Os produtos obtidos através da amplificação do PCR apresentaram o tamanho esperado (280pb), o que comprova a hipótese do microrganismo isolado ser do gênero *Erwinia carotovora*, sobretudo quando comparado ao padrão de bactéria enviado pela EMBRAPA (Figura 1).

Através dos testes bioquímicos descritos no item anterior, a bactéria foi identificada como sendo da subespécie *odorifera*. O resultado obtido através da técnica de PCR confirma o gênero da bactéria, mas não a subespécie.

Figura 1 – Gel de agarose (1,0%) dos produtos de amplificação do DNA via PCR de fragmentos de genes de *Erwinia carotovora*: A e B correspondem ao microrganismo isolado, enquanto C mostra o fragmento amplificado do microrganismo padrão, fornecido pela EMBRAPA.

Gene Recombinase A (<i>Erwinia carotovora</i>)	
<i>wasabiae</i>	TCTCACATGGGCCTTGCGG GCACGTATGATGAGCCAGG CTATGCGCAAATTGGCGGGTAAC
<i>odoriferum</i>	TCCCACATGGGGCTGGCTGCACGTATGATGAGCCAGGCTATGCGTAAACTGGCGGGTAAC
<i>betavasculorum</i>	TCCCACATGGGACTGGCTGCACGTATGATGAGCCAGGCTATGCGTAAACTGGCGGGTAAC
<i>carotovorum</i>	TCTCATATGGGCCTTGCGGCACGTATGATGAGCCAGGCTATGCGTAAGCTGGCGGGTAAC
	** ** * ** *
<i>wasabiae</i>	ACTCGCGTTAAAGTCGTGAAGAATAAAGTGGCAGCACCG GTTCAAACAGGCTGAATTCCAA
<i>odoriferum</i>	ACCCGCGTGAAAGTCGTGAAGAATAAAGTGGCAGCACCGTTCAAACAGGCTGAATTCCAA
<i>betavasculorum</i>	ACCCGTGTTAAAGTCGTGAAGAATAAAGTCGCAGCACCGTTCAAACAGGCTGAATTCCAA
<i>carotovorum</i>	ACCCGCGTGAAAGTCGTGAAGAACAAAATGGCCGCACGGTTCAAACAGGCTGAATTCCAA
	** ** *

Figura 2 – Alinhamento dos genes da recombinase A em subespécies de *Erwinia carotovora*.

Testes moleculares vêm sendo utilizados para a identificação de microrganismos e se baseiam na amplificação do gene de pectato liase ou mesmo de um fragmento de *Erwinia* sp. *Erwinias* pectinolíticas causadoras de podridão-mole foram isoladas de diferentes fontes e identificadas por diversos autores (Fiori & Schiaffino, 2004; Yap *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2004; Seo *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003; Hyman *et al.*, 2000; Hélias *et al.*, 1998; Darrasse *et al.*, 1994). A identificação do microrganismo via PCR através da utilização do gene da recombinase A, presente em pelo menos quatro subespécies de *Erwinia carotovora*: *E. carotovora* subesp. *wasabiae*, *E. carotovora* subesp. *odorifera*, *E. carotovora* subesp. *betavasculora* e *E. carotovora* subesp. *carotovora* (NCBI, 2005).

A metodologia de identificação proposta neste trabalho é uma alternativa de identificação da bactéria *E. carotovora* em relação às técnicas de PCR anteriormente descritas, baseadas na presença do gene da pectato liase (Duarte *et al.*, 2004; Hélias *et al.*, 1998).

5. CONCLUSÕES

A bactéria isolada de raízes tuberosas de mandioquinha foi identificada como *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera* através de testes bioquímicos e fisiológicos, e como *Erwinia carotovora*, via técnica de PCR. A *Erwinia* pectinolítica identificada está fortemente relacionada com o curto período de vida pós-colheita das raízes de mandioquinha.

Capítulo 3

Caracterização físico-química e reológica
do amido de mandioquinha-salsa
(*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.)

Capítulo 3 – Caracterização físico-química e reológica do amido de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.)

1. REVISÃO DA LITERATURA

O amido de mandioquinha

Algumas características físico-químicas e reológicas do amido extraído de raízes de mandioquinha-salsa já foram estudadas anteriormente. O teor de amido das raízes varia entre 15 e 36%, em base úmida (Leonel & Cereda, 2002; Pérez *et al.*, 1999), enquanto o teor de amido total extraído da planta, em base seca, é de 97,8% (Pérez *et al.*, 1999). Os grânulos possuem uma forma elipsóide e são truncados, com o diâmetro variando de 4 a 26 μm (Cereda, 2001; Pérez *et al.*, 1999). A presença de poros, ao longo da região equatorial do grânulo de amido de mandioquinha, medindo cerca de 2 μm de diâmetro, foi observada por microscopia eletrônica de varredura e já verificada em outros grânulos de amido, como os de milho (Santacruz *et al.*, 2002).

Santacruz *et al.* (2003) estudaram o poder de inchamento e a solubilidade do amido de mandioquinha. A solubilidade foi medida a 120° C e apresentou um resultado de 2,6 %, enquanto o poder de inchamento observado foi de 57,9 g / 100 g de amido.

A temperatura de gelatinização dos grânulos de amido de mandioquinha é mais baixa que a maioria dos outros amidos. A temperatura inicial de gelatinização foi analisada por DSC (*Differential scanning calorimetry* – calorimetria diferencial de varredura) e pelos viscoamilogramas Brabender e Rapid Visco-Analyzer. As faixas de gelatinização, encontradas para o amido de mandioquinha, foram de 62-95° C, 68-95° C e 56-73° C, respectivamente (Pérez *et al.*, 1998). Santacruz *et al.* (1998) verificaram, por DSC, a temperatura média de gelatinização do amido de mandioquinha e o teor de amilose de 60,1° C e $4 \pm 1\%$, respectivamente.

Tovar *et al.* (2002) determinaram enzimaticamente o teor de amido e de amilose de amido de mandioquinha: 95,8 g / 100 g e 21,2 %. O teor de amido

resistente e o índice de sinerese de géis, estocados por 24 h à 4° C, também foram determinados: 3,3 g / 100g (base seca) e 1,2 %.

A composição e as propriedades físico-químicas do amido de mandioquinha foram determinadas anteriormente (Tabelas 1 e 2) (Pérez *et al.*, 1999). Em relação às propriedades físicas, o amido de mandioquinha assemelha-se bastante ao de mandioca (Pérez *et al.*, 1999).

Tabela 1 – Composição do amido de mandioquinha (% em base seca)¹

Componente	% em base seca
Umidade	14,00 ± 0,12
Amido total*	97,87
Proteína	0,05 ± 0,01
Fibra	0,25 ± 0,02
Cinzas	0,13 ± 0,01
Gordura	0,07 ± 0,02
Açúcares totais	1,60 ± 0,06
Açúcares redutores	1,50 ± 0,06
Açúcares não-redutores	0,10 ± 0,03
Amilose	38,5 ± 1,3
Amilopectina	61,5 ± 1,5
Fósforo	0,063 ± 0,01
Fosfato	0,194 ± 0,01

* Calculado por subtração

¹Pérez *et al.*, 1999.

Tabela 2 – Propriedades físicas, físico-químicas e reológicas do amido de mandioca¹.

Propriedade	Valor
pH	7,0
Acidez (meq/g) x 10 ⁻⁴	3,0
Densidade absoluta (g/mL)	1,4032
Aw	0,602
Sinerese	Baixa tendência a sinerese
Tensão de cisalhamento (rpm)	
6	28.500
12	15.830
30	8.370
60	5.420

¹Pérez et al., 1999.

Segundo Pérez *et al.* (1999), o amido de mandioca apresenta dois estágios bem marcados de inchamento do grânulo. O primeiro ocorre rapidamente, entre 70 e 80° C, seguido de um estágio mais lento, a temperaturas acima de 85° C. Os dados de tensão de cisalhamento sugerem que o amido apresenta um comportamento característico de fluido não-newtoniano pseudo-plástico, a 30 e 50°C.

No Brasil, três empresas multinacionais respondem por grande parte da produção de amido: a *Corn Products Brasil* (filial da *Corn Products International*), a *Cargill*, e a *National Starch*, que comercializam o amido *nativo* (natural) ou modificado. O amido de mandioca ainda não é produzido por estas empresas. Poucos estudos de viabilização do processamento e das características físico-químicas e reológicas deste amido foram realizados até hoje. As propriedades de um amido proveniente de uma cultura com baixo rendimento em amido pode ser uma justificativa ao seu processamento – sem que se esqueça, é claro, dos pontos já mencionados, como o aproveitamento do excesso de safra. Além disso, o principal foco de processamento do amido, neste caso, não seria as grandes empresas, mas sim os pequenos e médios produtores de mandioca, através da adoção de métodos rústicos e simples de extração de amido.

Por outro lado, as indústrias de alimentos e os produtores agrícolas estão interessados na identificação e no desenvolvimento de espécies que produzam amidos nativos com características físico-químicas especiais, que poderiam substituir amidos modificados quimicamente. Além disso, muitos setores alimentares estão à procura de amidos naturais, dado que os amidos modificados são considerados como aditivos alimentícios, onde seu uso é limitado pela legislação e devem ser declarados no rótulo (Cereda, 2001).

O processamento das raízes de mandioca não é comum na maioria dos países onde a planta é cultivada. O fato de as raízes de mandioca serem comercializadas frescas é importante, primeiramente, em razão de sua extrema perecibilidade. A mandioca-salsa é uma matéria-prima com potencial de aproveitamento como fonte de amido, uma vez que é comercializada em entrepostos hortigranjeiros com preços bastante elevados, relacionados à sua alta perecibilidade (Cereda, 2001). Além disso, a fina casca das raízes de mandioca propicia um excelente aproveitamento da planta, já reportado na literatura (Cereda, 2001), que chega a atingir 23% de rendimento. Amante *et al.* (1998) justifica o porquê do uso de amidos tuberosos ainda não estar amplamente difundido, principalmente quando comparado à cultura da mandioca, onde o diferencial está na extração de seu amido, que sedimenta rapidamente, gera bons rendimentos, e é livre de pigmentos e impurezas, em contraste com outros amidos, como o da mandioca, que é uma planta amarela (Cereda, 2001). No entanto, a utilização exclusiva do amido de mandioca não é suficiente, pois amidos de diferentes fontes são necessários para atender a uma ampla diversidade mercadológica e tecnológica (Amante *et al.*, 1998).

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais:

Estudar as características físico-químicas do amido de mandioquinha extraído em laboratório.

Objetivos específicos:

Caracterizar aspectos de composição, físico-químicos e reológicos do amido de mandioquinha, tais como os teores de amido total e de amilose, a morfologia, a viscosidade e a turbidez da pasta de amido, a capacidade de retenção de água (sinerese) e a firmeza dos géis de amido formados sob diferentes condições de temperatura, pH, e a concentração de amido, mediante o emprego da ferramenta estatística já mencionada (MSR).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – MATERIAIS

Material vegetal

Para a extração e determinação das propriedades físico-químicas do amido, foram utilizadas as raízes mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Cv. *Amarela de Senador Amaral*), também fornecidas pelo CEAGESP um dia pós-colheita.

Reagentes

Todos os outros reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico.

3.2 – MÉTODOS

3.2.1 – Extração do amido

A metodologia, utilizada para a extração do amido de mandioquinha em escala laboratorial, foi baseada em alguns processos de isolamento de amido encontrados na literatura (Hermann, 2004; Santacruz et al., 2002; Nkala et al., 1994), com modificações. As raízes foram inicialmente pesadas, lavadas em água corrente, descascadas e cortadas em cubos com aproximadamente 1,0 cm de aresta. A homogeneização das raízes com água destilada (1:1) foi feita em liquidificador comum, durante três minutos e, em seguida, filtradas em peneira de tecido. O resíduo da filtração foi re-suspenso em água destilada (1:3) e centrifugado a $10.000 \times g$ por 30 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o decantado foi re-suspendido em água destilada (1:1) e novamente centrifugado. Este procedimento – lavagem do decantado, seguida de centrifugação – foi repetido pelo menos dez vezes até que um sedimento de amido branco e limpo fosse obtido após a centrifugação. Ao final do último processo de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o resíduo foi colocado em papéis absorventes sob sistema de circulação forçada de ar, à temperatura ambiente, por aproximadamente 16 h.

Após a secagem, o amido obtido, em flocos, foi triturado em moinho (IKA® A10, Labortechnik, Alemanha) para a obtenção de um pó fino. Por fim, o amido obtido foi pesado para fins de cálculo de seu rendimento.

3.2.2 – Viscosidade

A determinação da viscosidade da pasta de amido de mandioquinha foi feita conforme o método descrito por Afoakwa & Sefa-Dedeh (2002) e Garcia & Walter (1998). Uma solução de 6% de amido (em base seca) foi transferida para o Brabender Viscoamylograph e aquecida de 25 a 95°C, a uma taxa de 2°C/min. A pasta foi, então, mantida a 95°C por 15 minutos e resfriada a 2°C/min até 50°C. Utilizando um “cartridge” de 700 cmg a uma rotação de 750 rpm, foi determinada a curva de viscosidade, nas condições descritas acima, que possibilita verificar a temperatura onde a viscosidade da pasta é máxima (pico de viscosidade), a viscosidade da pasta na temperatura máxima (95°C), a viscosidade da pasta após 15 min a 95°C, e a viscosidade após o resfriamento a 50°C. Estes experimentos foram repetidos três vezes e os dados obtidos foram apresentados em forma de tabela.

3.2.3 – Determinação do teor de amido total

Na determinação do teor de amido total foi adotado o mesmo protocolo descrito anteriormente (Arêas & Lajolo, 1981). No entanto, foram utilizados 50 mg do amido de mandioquinha extraído para a quantificação. Os experimentos foram feitos em triplicata e repetidos, pelo menos, duas vezes.

3.2.4 – Determinação do teor de amilose

O teor de amilose do amido foi determinado através da metodologia descrita por Morrison & Laignelet (1983). As amostras (40 mg de amido isolado) foram dissolvidas em 5,0 mL de uma solução de UDMSO (dimetilsulfoxido e uréia a 6,0 M, 9:1). Após agitação vigorosa em vortex, os tubos foram colocados em banho de água fervente por 20 minutos e então transferidos a uma estufa a 100°C por mais 90 min, para assim garantir a total gelatinização do amido. Após resfriamento em banho de gelo, uma alíquota de 1,0 mL desta solução (amido-UDMSO) foi transferida a uma proveta e 95 mL de água foram adicionados, em quatro porções, sob agitação

vigorosa após cada adição. 2,0 mL de uma solução I_2 -KI (2 mg I_2 , 20 mg KI/mL) foram acrescentados e o conteúdo foi novamente misturado com vigor. O volume final foi ajustado a 100 mL com água destilada e a leitura de absorbância da solução foi feita a 635 nm em espectrofotômetro contra o branco, uma solução de UDMSO- I_2 -KI sem amido. O teor de amilose foi determinado por meio da curva de calibração, com 0-100% de amilose, usando misturas de soluções de amilose e amilopectinas puras. Todas as amostras foram preparadas em triplicata e repetidas, pelo menos, três vezes.

3.2.5 – Turbidez

A turbidez do amido de mandioca foi determinada conforme o protocolo descrito por Perera & Hoover (1999). 2% de soluções aquosas de amido de mandioca foram aquecidas em banho de água fervente por 1h, sob agitação a cada 5 min (vórtex). As suspensões foram resfriadas à temperatura ambiente por 1h. As amostras foram estocadas por cinco dias a 4°C em um refrigerador doméstico e a turbidez das soluções foi medida a cada 24 h através da medida de absorbância a $\lambda = 640$ nm em espectrofotômetro contra o branco (água), a partir do tempo zero. As amostras foram preparadas em triplicata e o experimento foi realizado três vezes.

3.2.6 – Microscopia eletrônica de varredura do amido de mandioca em diferentes estágios do processo de extração

Para a realização da microscopia eletrônica de varredura dos amidos extraídos, as amostras foram preparadas como descrito anteriormente (Capítulo 1 - item 3.2.10 - Extração do amido de mandioca em diferentes estágios de deterioração e observação em microscópio eletrônico).

Os grânulos de amido observados em microscópio eletrônico foram obtidos em diferentes estágios do processo de extração: 1) 1º estágio de centrifugação, 2) 5º estágio de centrifugação e no 3) 10º e último estágio do processo de isolamento do amido.

3.2.7 – Formação do gel de amido

As soluções de amido de mandioquinha foram preparadas em diferentes concentrações (de 8 a 16%, Tabela 3), em base seca, em distintos pHs: tampão fosfato 20 mM, pHs 6,0, 7,0 e 8,0, e tampão citrato 20 mM, pHs 4,0 e 5,0. Estes mesmos valores de pH foram estudados por Rojas *et al.* (1997) em géis de proteínas de soro de leite. As soluções foram aquecidas em banho de água por 5 minutos a diferentes temperaturas (60 a 80°C, Tabela 3). Após o resfriamento por 30 minutos em banho de gelo, os testes de firmeza e de capacidade de retenção de água (sinerese) foram determinados nos termos do protocolo descrito a seguir.

Tabela 3 – Condições de formação do gel de amido de mandioquinha: valores em escala e reais.

Experimento	Valores em escala			Valores reais		
Tratamento	X ₁	X ₂	X ₃	pH	T (°C)	C (%)
1	-1	-1	-1	5,0	65	10
2	1	-1	-1	7,0	65	10
3	-1	1	-1	5,0	75	10
4	1	1	-1	7,0	75	10
5	-1	-1	1	5,0	65	14
6	1	-1	1	7,0	65	14
7	-1	1	1	5,0	75	14
8	1	1	1	7,0	75	14
9	0	0	0	6,0	70	12
10	0	0	0	6,0	70	12
11	-2	0	0	4,0	70	12
12	2	0	0	8,0	70	12
13	0	-2	0	6,0	60	12
14	0	2	0	6,0	80	12
15	0	0	-2	6,0	70	8
16	0	0	2	6,0	70	16

3.2.8 – Capacidade de retenção de água

Os ensaios para a determinação da capacidade de retenção de água dos géis de amido de mandioca foram realizados segundo o método descrito por Rojas *et al.* (1997). As amostras, elaboradas conforme o protocolo descrito anteriormente, foram preparadas em tubos Eppendorf de 1,5 mL e centrifugadas a $10.000 \times g$, por 30 minutos, usando o Eppendorf Micro Centrifuge 5417 C (Brinkmann Instruments Canadá Ltd, Mississauga, Ont.). Os tubos foram pesados antes e após a centrifugação e removido o líquido sobrenadante, expelido após a centrifugação. A diferença entre estes dois valores foi considerada como a porcentagem de água expelida.

Realizados os experimentos, o *modelo de superfície de resposta* (MSR) foi empregado para estimar as condições de preparo do gel de mandioca onde a menor quantidade de água foi expelida (menor grau de sinerese).

Segundo a análise estatística (MSR), os géis que apresentaram menor grau de expulsão de água foram preparados e estocados por dois dias à temperatura ambiente e de refrigeração, com o objetivo de se verificar o efeito da estocagem na capacidade de retenção de água dos géis de amido de mandioca.

3.2.9 – Análise da firmeza do gel

A força máxima (firmeza, N) dos géis de mandioca preparados foi medida através do texturômetro SMS (modelo TAXT2i, Stable Micro System, England), equipado com um probe cilíndrico P/25. Foram utilizados os seguintes parâmetros: velocidade de pré-teste: 5,0 mm/s; velocidade do teste: 1,0 mm/s; velocidade pós-teste: 5,0 mm/s; distância de perfuração: 1,0 mm. Cada gel foi preparado em triplicata em béqueres de 50 mL (5,5 cm de altura por 4,5 cm de diâmetro) e foram realizados no mínimo quatro testes para cada tipo de gel. Esse ensaio objetivou avaliar a textura dos géis de amido de mandioca estudados, inclusive quanto à capacidade de retenção de água (sinerese).

3.2.10 – Modelo experimental: MSR e análise de dados

O efeito das variáveis X_1 (pH), X_2 (temperatura, °C) e X_3 (concentração de amido, %), durante o processo de gelatinização do amido de mandioca, a cinco níveis de variação, foi determinado conforme o Delineamento Central Composto (DCC) (Barros Neto et al., 2002), como mostrado anteriormente na Tabela 3, com 16 experimentos e 15 tratamentos.

Esse modelo foi aplicado nos testes de compressão (firmeza do gel) e na determinação da capacidade de retenção de água dos géis. A resposta Y do modelo foi, então, Y_1 = % de água expelida para os ensaios de capacidade de retenção de água e Y_2 = Firmeza (N) para os testes de compressão.

Os dados foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e regressão linear, através do pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS) (SAS version 6.0, SAS Institute Inc., Cary, NC).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Extração do amido

O rendimento do amido extraído em escala laboratorial variou de 14,3 a 17,5%, com uma média de 15,8% (Tabela 4). O amido foi facilmente separado das raízes de mandioquinha devido ao alto teor de água e à baixa concentração de material fibroso das raízes, principalmente quando comparado à extração de amido de mandioca. A etapa de lavagem do sedimento foi extremamente importante para se obter uma amostra de amido limpo e claro (branco). A variação no rendimento final do amido se deu a perdas experimentais conseqüentes do processo (parte do amido pode ser perdida durante o processo de descarte do sobrenadante entre os ciclos de centrifugação). Segundo Cereda (2001), o rendimento da extração de amido de mandioquinha pode variar de 5 a 23%, dependendo da eficiência do processo.

O rendimento da ahipa, uma leguminosa originária da América do Sul, considerada uma matéria-prima amilácea interessante em razão de seu rápido desenvolvimento (apresenta 5 meses de ciclo de cultivo), considerável adaptabilidade às variações climáticas e elevado teor de amido (45-55%, em base seca), apresenta-se bem abaixo ao de mandioquinha, que é de 4,3% (Leonel *et al.*, 2003), enquanto o rendimento do amido de batata doce e o de mandioca variam de 28,3 a 31,8 % e 24,6 a 27,8 %, respectivamente (Abera & Rakshit, 2003; Madhusudhan *et al.*, 1992).

Tabela 4 – Características do amido de mandioquinha: rendimento do processo de extração, teor de amido total e de amilose.

Características	Valores (%)
Rendimento	15,8 ± 1,3
Teor de amilose	12,1 ± 0,3
Amido total	87,8 ± 2,5

4.2 – Viscosidade

O Viscoamilograma Brabender (VB) fornece informações de grande utilidade sobre as características da viscosidade de pastas de amido durante o aquecimento e resfriamento, tais como a temperatura na qual o amido começa a se ligar (gelatinização), a estabilidade da viscosidade durante o período de agitação à temperatura constante (95° C), e como ele se comporta durante o resfriamento. Um amido ideal seria aquele em que a viscosidade máxima, uma vez alcançada, se mantenha estável durante o processo de agitação e resfriamento (Pazoa, 1996).

Na indústria, o amido ideal para muitos produtos alimentícios deve preencher dois conjuntos essenciais e complementares de requisitos. Em primeiro lugar, em baixas concentrações deve produzir a textura desejada e uma pasta encorpada que se mantenha leve e flexível a baixas temperaturas. Depois, o amido deve preservar a sua capacidade de espessar-se a altas temperaturas e sob tensão de cisalhamento. Por isso, o estudo das propriedades reológicas do amido é de extrema importância (Garcia & Walter, 1998).

A Tabela 5 e a Figura 1 mostram o comportamento reológico do amido medido por VB. Durante o ciclo de aquecimento, de 25 a 95°C (46 min), a pasta de amido de mandioquinha apresentou um ponto máximo de viscosidade a 28 min, de 1400 Unidades Brabender (UB). Neste pico, a temperatura da pasta foi de 62°C, que é a temperatura de gelatinização do amido de mandioquinha. A 95°C, a viscosidade da pasta foi de 610 UB e, após 15 min nesta temperatura, a viscosidade diminuiu para 470 UB, aumentando para 580 UB ao final do ciclo de resfriamento, à temperatura de 50°C. A consistência da pasta, após 15 min a 95°C, fornece uma estimativa de sua resistência à desintegração durante o processo de aquecimento e resfriamento. A viscosidade do amido de mandioquinha diminuiu de 610 até 470UB durante a análise, mostrando uma pequena resistência à quebra. O pequeno aumento na viscosidade da pasta, durante o ciclo de resfriamento de 470 a 580 UB, foi, muito provavelmente, devido a gelatinização e ao conseqüente intumescimento dos grânulos de amido de mandioquinha, que iniciaram o processo de associação – ou de retrogradação, em função da diminuição da temperatura da pasta.

Tabela 5 – Viscoamilograma Brabender: parâmetros reológicos expressos em Unidades Brabender (UB) para o amido de mandioca.

Parâmetros reológicos	Valores
Viscosidade inicial (UB)	0
Pico de viscosidade (UB)	1400 ± 7
Temperatura do pico de viscosidade (°C)	62 ± 1
Viscosidade a 95°C (UB)	610 ± 7
Viscosidade após 15 min a 95°C (UB)	470 ± 6
Viscosidade final, resfriamento a 50°C (UB)	580 ± 14

Figura 1 – Viscoamilograma Brabender: medida de viscosidade do amido de mandioca extraído em escala laboratorial.

O amido de inhame apresenta valores de viscosidade similares ao observado no amido de mandioca, após o ciclo de resfriamento a 50°C: em torno de 500 BU (Afoakwa & Sefa-Dedeh, 2002). Pérez et al. (1999) encontraram resultados paralelos de viscosidade final a 95 e 50° C para o amido de mandioca de um cultivar diferente da *Amarela de Senador Amaral*, que foi de 740 e 620 UB, respectivamente. Contudo, foi encontrado um menor valor de pico de viscosidade, de 760 UB. Bermudez (1997) detectou valores de viscosidade máxima para três variedades de mandioca-salsa: de 1180, 717 e 500 UB. Nas três variedades (distintas da variedade estudada no presente trabalho), a viscosidade a 95° C, após 20 min nesta temperatura, foi de 355 UB e, após o resfriamento a 50° C, de 487 UB.

A alta viscosidade e a relativa estabilidade da pasta de amido de mandioca durante o cozimento são características apreciáveis na formulação de produtos alimentícios instantâneos, como sopas desidratadas e pudins.

4.3 – Determinação do teor de amido total e amilose

Os teores de amilose dos grânulos de amido variam conforme a fonte botânica do amido, mas também são afetados pelas condições climáticas e pelo tipo de solo. A atividade de enzimas envolvidas na biossíntese do amido também pode responder pela variação do teor de amilose dos diferentes amidos. Amidos provenientes de uma mesma planta podem apresentar diferentes valores em seus teores de amilose, fato atribuível não só aos diferentes métodos de extração do amido, como também aos métodos analíticos empregados na quantificação do teor de amilose (Singh *et al.*, 2003).

Os valores do teor de amido total e de amilose constam da Tabela 4, apresentada anteriormente. O amido total da mandioca *Amarela de Senador Amaral* na preparação, representa 87,8% (base seca) do amido isolado (farinha), cujo teor de amilose determinado foi de 12,1 %. Cereda (2001) e Brito e Espin (1996) reportaram um teor de amido total de 48 a 55% e 68,2%, respectivamente, em base seca.

Tovar *et al.* (2002) encontraram o teor de amido total para a mandioca de 95,8 g por 100 g de amostra seca. Em relação ao teor de amilose, conforme observa a literatura, os valores encontrados para a mandioca variam de 3,0 a 23,0 %, conforme seja a metodologia utilizada para a detecção e a variedade das raízes analisadas (Santacruz *et al.*, 2002; Santacruz *et al.*, 2003; Tovar *et al.*, 2002).

O teor de amilose do amido é um dado importante no que diz respeito às suas propriedades de gelatinização e de retrogradação. Amidos com alto teor de amilose, como a batata (20,1 a 31,0 %), milho (22,4 a 32,5 %), taro (28,7 a 29,9%), inhame (27,8 a 29,2%), batata doce (20,5 a 25,5 %) e mandioca (18,6 a 23,6 %), apresentam alta sinerese, grande quantidade de água expulsa durante o processo de retrogradação. Esse fenômeno é indesejável durante o resfriamento e o armazenamento de produtos alimentícios, devido à instabilidade que causa ao alimento processado (Singh *et al.*, 2003; Gunaratne & Hoover, 2002; Hoover, 2001; Garcia & Walter, 1998). O amido de mandioca com um teor de amilose natural

de 12,1 % (intermediário) pode ser uma alternativa interessante ao uso de amidos modificados, que apresentam menor conteúdo de amilose. Na Europa existem muitos projetos em andamento para se obter, via engenharia genética, variedades de batatas com um teor muito baixo de amilose, para propósitos industriais (Santacruz *et al.*, 1998).

A ahipa apresenta um teor de amido mais baixo que o da mandioquinha: em torno de 43% (Leonel *et al.*, 2003). No entanto, o teor de amilose encontrado pelos autores foi semelhante ao da mandioquinha, de 12,84%.

Em diferentes cultivares de batata doce, o teor de amido e de amiloses variam de 43,4 a 79,4 % e de 17,0 a 22,0 %, respectivamente (Madhusudhan *et al.*, 1992). O teor de amilose também pode variar de acordo com o tempo de colheita: em batatas, uma colheita tardia pode reduzir de 22,0% a 18,1% o teor de amilose (Noda *et al.*, 2004).

4.4 – Determinação do teor de amido total nos diferentes estágios de extração do amido de mandioquinha

O principal objetivo deste experimento foi de verificar se haveria perda de material amiláceo durante as sucessivas etapas de lavagem e de centrifugação dos resíduos e em toda a fase de extração do amido.

A Figura 2 mostra o teor de amido total (%) nos dez diferentes estágios de lavagem e centrifugação dos resíduos. Embora o rendimento do processo seja menor no último estágio (10ª centrifugação, Figura 2) em relação ao primeiro, o teor de amido total é de 87,8%, superior ao detectado no primeiro estágio, que foi de 59,0%. Estes resultados mostram a importância do grande número de etapas de lavagem e centrifugação do resíduo para a obtenção do amido mais purificado, sobretudo pela remoção dos resíduos de parede celular.

Figura 2 – Teores de amido total (%) nos dez diferentes estágios de lavagem e centrifugação, durante o processo de extração do amido de mandioca.

4.5 – Turbidez

A turbidez das suspensões de amido de mandioca gelatinizados apresentou relativa estabilidade durante o armazenamento, evidenciando uma pequena diminuição na turbidez somente após 24 h de estocagem (Tabela 6). Estes resultados mostram uma grande estabilidade dos grânulos de amido nessas condições. Alguns fatores, como o entumescimento do grânulo, o teor de amilose, as proporções entre a amilose e a amilopectina, e as ligações intra e inte-moleculares, têm sido descritas como responsáveis pelo processo de turbidez desenvolvido por amidos durante o armazenamento (Singh & Singh, 2001).

Em amidos de batata, os valores de turbidez aumentaram gradativamente durante 5 dias de armazenamento a 4° C, variando de 1,25 a 1,81 nm do 1° ao 5° dia de estocagem (Kauar et al., 2002). Resultados similares foram encontrados por Singh & Singh (2001), onde a turbidez do amido de batata variou de 1,15 a 1,68 nm, ao final do quinto dia de armazenamento.

Tabela 6 – Efeito do armazenamento na turbidez da solução de amido de mandioca.

Tempo de Estocagem (h)	Turbidez (absorbância a 640 nm)
0	1,32 ± 0,02
24	1,10 ± 0,14
48	1,08 ± 0,04
72	1,13 ± 0,15
96	1,09 ± 0,03

4.6 – Microscopia eletrônica de varredura do amido de mandioca em diferentes estágios do processo de extração

Como no experimento para a verificação do teor de amido realizado anteriormente (item 4.4), este ensaio objetivou, também, verificar a necessidade dos repetidos processos de lavagem e centrifugação do resíduo amiláceo, durante o processo de extração do amido de mandioca, através da observação em microscopia eletrônica de varredura.

Como durante o processo de extração ocorrem perdas de amido e redução de seu rendimento, o amido resultante, por exemplo, do resíduo do 5º processo de centrifugação (intermediário) poderia apresentar a mesma quantidade de restos celulares em relação ao 10º e último processo de centrifugação, com a vantagem de apresentar um maior rendimento. Por microscopia eletrônica de varredura foi difícil identificar o grau de “pureza” de cada um destes resíduos de amido ao longo dos ciclos de lavagem e centrifugação (Figura 3). Abordando-se um campo onde o aumento microscópico foi menor (Figuras 3A, 3D e 3G), pode-se verificar a diminuição de tamanho destes resíduos da Figura 3G (10º e último resíduo de centrifugação) em relação à Figura 3A (1º resíduo de centrifugação). No entanto, para a confirmação desta hipótese, seria necessário um estudo estatístico de vários campos para se ter certeza de que o aumento do número de ciclos de lavagem e centrifugação do resíduo minimiza a presença de resíduos e restos celulares, resultando numa preparação com maior grau de pureza.

Figura 3 – Micrografia eletrônica de varredura do grânulo de amido de mandioca extraído em diferentes estágios do processo de centrifugação: 1º resíduo de centrifugação (A, B e C), 5º resíduo de centrifugação (D, E e F) e 10º resíduo (G, H e I).

4.7 – Capacidade de retenção de água

Após o processo de gelatinização, ou perda da ordem cristalina, quando o amido é resfriado à temperatura ambiente, forças inter-moleculares provocam um rearranjo que favorece a cristalização. Este processo é conhecido como retrogradação, que acompanha a expulsão de água presente na estrutura – a sinerese (Parker & Ring, 2001).

Nas indústrias de alimentos, o amido pode ser empregado como agente de corpo ou estabilizante em sopas, pudins, molhos de saladas etc. Em todas essas aplicações, são de suma importância a capacidade de retenção de água do amido e a textura da pasta formada. Quando o objetivo é manter o grânulo de amido intumescido o mais intacto possível, sem maiores dispersões inter-moleculares, como é o caso dos pudins prontos para consumo, onde a retrogradação é um fator negativo de qualidade, o uso de amidos com baixo ou com um valor de amilose intermediário, pode ser importante na formulação (Garcia & Walter, 1998).

Os resultados sinerese dos 16 experimentos são mostrados nas Tabelas 7, 8 e 9 e na Figura 4. O modelo matemático, expresso em variáveis codificadas e calculado através do software Statistica, foi:

$$Y_{\text{calc}} (\text{Sinerese } \%) = 4,08 - 1,00x_1 - 0,41x_2 - 3,26x_3 - 0,18x_1x_1 + 0,53x_2x_2 + 1,25x_3x_3 - 0,10x_1x_2 + 1,89x_1x_3 + 0,36x_2x_3$$

O pH (x_1), a concentração de amido (x_3), o termo quadrático da concentração de amido (x_3x_3) e a interação entre o pH e a concentração de amido (x_1x_3) das preparações de géis de amido, influenciaram significativamente a capacidade de retenção de água ($p < 0,05$, Tabelas 8 e 9). O modelo estimou os seguintes valores: $R^2 = 0,97$ e $R^2_{\text{adj}} = 0,92$.

De acordo com o modelo estatístico, as melhores condições de preparo do gel, visando a menor sinerese, ocorrem quando o gel é preparado em pH 6,8, a 70°C, e com uma concentração de amido de 13,37%. Neste ponto, o gel de amido de mandioquinha apresentou maior capacidade de retenção de água, que representa 2,53% de sinerese. Um novo experimento foi feito nestas condições, com o objetivo de validar o ponto ótimo, e o valor de sinerese encontrado

experimentalmente foi similar ao calculado pelo modelo: 3,01% (ver experimento 17, Tabela 7).

Os géis apresentaram grande estabilidade quando armazenados a 4°C e uma baixa estabilidade, quando estocados à temperatura ambiente. A porcentagem de água expelida dos géis foi de 1,50 e 8,08 %, durante o armazenamento, por 2 dias, a 4°C e à temperatura ambiente, respectivamente (ver Tabela 7, experimentos 18 e 19). Dufour & Bermudez (1996) demonstraram um comportamento particular do amido de mandioca: após uma semana de congelamento à -20°C, a taxa de sinerese diminuiu a cada semana até a sexta semana de armazenamento, o que foi considerado uma grande vantagem na aplicação em alimentos congelados.

Embora a melhor temperatura encontrada para o preparo do gel – que representa o menor valor de sinerese – tenha sido de 70°C, os géis de amido de mandioca podem ser preparados em temperaturas mais baixas, pois a temperatura de formação do gel não é uma variável significativa na capacidade de retenção de água do gel de amido de mandioca. Esta vantagem pode ser explorada em processos onde o gel de amido é preparado em larga escala, considerando que a baixa temperatura de gelatinização utiliza menos energia durante a formação do gel. Para o planejamento do modelo estatístico de superfície de resposta, a escolha do valor mais baixo de temperatura de formação do gel (60°C) se baseou na temperatura de gelatinização do amido de mandioca encontrado na literatura e determinado por calorimetria diferencial de varredura (*Differential scanning calorimetry* – DSC) (Santacruz *et al.* 2002; Santacruz *et al.*, 1998).

O pH da solução de amido afeta significativamente a porcentagem de água expelida. Em preparações de amido, esta informação é muito útil, considerando a ampla variedade de suas aplicações em produtos alimentícios, como pudins, iogurtes, papinhas infantis, entre outros, que possuem diferentes valores de pH.

A concentração de amido é também uma variável significativa neste modelo. Concentrações mais altas ou mais baixas de amido, em ao valor estimado pelo modelo (13,37%), produzem um gel com menor capacidade de retenção de água. Vale mencionar que sais e outros componentes de misturas alimentares, que poderiam afetar esse desempenho, não foram avaliados.

Amidos de batata apresentaram valores de sinerese de 6,7 a 8,2 % de sinerese, que oscilaram conforme a variedade, após 48 h de armazenamento à 4°C. A suspensão foi aquecida à 90° C, durante 1 h, com uma concentração de amido de 6,7% (Kaur *et al.*, 2002). Este amido apresenta menor estabilidade em relação à estocagem, quando comparado ao amido de mandioquinha. Singh & Singh (2001) encontraram valores de sinerese de 9,2 a 10,8 % para o amido de batata. Vale notar que, na maioria dos trabalhos consultados, poucos estudos se referem à variação da capacidade de retenção de água frente a alterações de pH do gel de amido; isso deve ser considerado, principalmente, na formulação de produtos à base de amido, uma vez que o comportamento do gel varia segundo o pH do alimento.

Tabela 7 – Condições de formação do gel de amido de mandioca: valores reais e resultados experimentais (sinerese e firmeza dos géis de amido).

Experimento		Valores reais		Resultados experimentais	
Tratamento	pH	T (°C)	C (%)	% de água expelida	Firmeza (N)
1	5,0	65	10	12,52	0,69
2	7,0	65	10	6,43	0,84
3	5,0	75	10	11,86	1,05
4	7,0	75	10	5,10	0,80
5	5,0	65	14	2,43	1,87
6	7,0	65	14	3,65	2,01
7	5,0	75	14	2,92	3,75
8	7,0	75	14	4,03	3,55
9	6,0	70	12	3,46	1,46
10	6,0	70	12	3,84	1,21
11	4,0	70	12	4,31	1,83
12	8,0	70	12	1,55	1,90
13	6,0	60	12	7,13	0,19
14	6,0	80	12	4,38	2,54
15	6,0	70	8	15,99	0,40
16	6,0	70	16	1,33	2,59
17	6,8	70	13,37	3,01	-
18*	6,8	70	13,37	1,50	-
19*	6,8	70	13,37	8,08	-

*Géis armazenados à temperatura de refrigeração (18) e à temperatura ambiente (19).

Figura 4 – Modelo de superfície de resposta para a capacidade de retenção de água de géis de amido de mandioquinha, em função da temperatura de formação do gel e da concentração do amido, em pH 7,0.

Tabela 8 – ANOVA para a capacidade de retenção de água de géis de amido de mandioquinha em função da concentração do pH (x_1), da temperatura (x_2) e da concentração de amido (x_3) utilizados no preparo dos géis.

Efeitos	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor F	Valor p
x_1	16,0801	1	16,0801	11,3722	0,015000
x_1x_1	0,5184	1	0,5184	0,3666	0,567033
x_2	2,7390	1	2,7390	1,9371	0,213389
x_2x_2	4,4310	1	4,4310	3,1337	0,127084
x_3	170,3025	1	170,3025	120,4412	0,000034
x_3x_3	25,1001	1	25,1001	17,7513	0,005603
x_1x_2	0,0760	1	0,0760	0,0538	0,824312
x_1x_3	28,8041	1	28,8041	20,3708	0,004046
x_2x_3	1,0225	1	1,0225	0,7231	0,427754
Erro	8,4839	6	1,4140	-	-
SQ Total	267,1591	15	-	-	-

Tabela 9 – Efeitos estimados, erro padrão e valor t (distribuição t-Student) dos dados experimentais referentes a sinerese de géis de amido de mandioquinha.

Efeitos	Parâmetros estimados	Erro padrão	Valor t	Valor p
Interação	4,08437	0,786524	5,1929	0,002029
x_1	-2,00500	0,594556	-3,3723	0,015000
x_1x_1	-0,36000	0,594556	-0,6055	0,567033
x_2	-0,82750	0,594556	-1,3918	0,213389
x_2x_2	1,05250	0,594556	1,7702	0,127084
x_3	-6,52500	0,594556	-10,9746	0,000034
x_3x_3	2,50500	0,594556	4,2132	0,005603
x_1x_2	-0,19500	0,840830	-0,2319	0,824312
x_1x_3	3,79500	0,840830	4,5134	0,004046
x_2x_3	0,71500	0,840830	0,8504	0,427754

4.8 – Análise de firmeza do gel

Os resultados dos 16 experimentos de determinação da firmeza (N) dos géis de amido de mandioquinha são mostrados nas Tabelas 7, 10 e 11 e na Figura 5. O modelo matemático, expresso em variáveis codificadas e calculado através do software Statistica, foi o seguinte:

$$y_{\text{calc}} (\text{Firmeza (N)}) = 1,49 - 0,00x_1 + 0,53x_2 + 0,76x_3 + 0,13x_1x_1 + 0,01 x_2x_2 + 0,04x_3x_3 - 0,09x_1x_2 + 0,01 x_1x_3 + 0,39x_2x_3$$

A temperatura (x_2), a concentração de amido (x_3), e a interação entre a temperatura e a concentração de amido (x_2x_3) das preparações de géis, influenciaram significativamente a textura dos géis de amido de mandioquinha ($p < 0,05$, Tabelas 10 e 11). O modelo estimou os seguintes valores: $R^2 = 0,93$ e $R^2_{\text{adj}} = 0,82$.

De acordo com o modelo, as melhores condições de preparo do gel de amido de mandioquinha, visando a uma “otimização da textura”, são atingidas quando o gel é preparado em pH 5,4, à 69°C, e com um concentração de amido de 9,11%. Entretanto, observando-se os gráficos e considerando os dados significativos, gerados pelo modelo, os maiores valores de firmeza dos géis de mandioquinha foram obtidos quando o gel de amido foi preparado em temperaturas mais altas e com grandes concentrações de amido.

Este experimento foi realizado com base no modelo delineado para determinar a capacidade de retenção de água do amido de mandioquinha e, portanto, não tem como principal objetivo verificar qual o tipo de gel com maior grau de firmeza, mas sim estudar as características de textura dos géis preparados para a análise de sinerese. Em geral, pode-se dizer que a capacidade de retenção de água dos géis não está diretamente relacionada ao seu maior grau de firmeza, ou seja, o gel no qual foi observado um menor grau de sinerese não apresenta, necessariamente, a maior rigidez.

O modelo de superfície de resposta apresentou, tanto para a sinerese quanto para a firmeza dos géis de mandioquinha, altos valores de R^2 (Tabelas 8, 9, 10 e 11). O ajuste do modelo pode ser ilustrado através da curva de respostas obtidas experimentalmente *versus* os valores previstos pelo modelo, apresentado na Figura

6, que, como já afirmado anteriormente, deve ser o mais próximo possível da reta diagonal, traçada em vermelho.

Figura 5 – Modelo de superfície de resposta para a firmeza de géis de amido de mandioquinha, em função da temperatura de formação do gel e da concentração de amido, a pH 7,0.

Tabela 10 – ANOVA para a firmeza de géis de amido de mandioquinha em função da concentração do pH (x_1), da temperatura (x_2) e da concentração de amido (x_3) utilizados no preparo dos géis.

Efeitos	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor F	Valor p
x_1	0,00003	1	0,00003	0,00014	0,991435
x_1x_1	0,28090	1	0,28090	1,40679	0,280425
x_2	4,45210	1	4,45210	22,29673	0,003251
x_2x_2	0,00090	1	0,00090	0,00451	0,948654
x_3	9,27202	1	9,27202	46,43558	0,000490
x_3x_3	0,02560	1	0,02560	0,12821	0,732557
x_1x_2	0,06845	1	0,06845	0,34281	0,579553
x_1x_3	0,00020	1	0,00020	0,00100	0,975779
x_2x_3	1,20125	1	1,20125	6,01603	0,049605
Erro	1,19805	6	0,199675	-	-
SQ Total	16,54770	15	-	-	-

Tabela 11 – Efeitos estimados, erro padrão e valor t (distribuição t-Student) dos dados experimentais referentes a firmeza de géis de amido de mandioquinha.

Efeitos	Parâmetros estimados	Erro padrão	Valor t	Valor p
Interação	1,487500	0,295564	5,032759	0,002374
x_1	-0,002500	0,223425	-0,011189	0,991435
x_1x_1	0,265000	0,223425	1,186080	0,280425
x_2	1,055000	0,223425	4,721942	0,003251
x_2x_2	0,015000	0,223425	0,067137	0,948654
x_3	1,522500	0,223425	6,814366	0,000490
x_3x_3	0,080000	0,223425	0,358062	0,732557
x_1x_2	-0,185000	0,315971	-0,585497	0,579553
x_1x_3	0,010000	0,315971	0,031649	0,975779
x_2x_3	0,775000	0,315971	2,452759	0,049605

5. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos no presente trabalho, é possível concluir que:

1. o amido de mandioquinha apresentou um teor de amilose abaixo dos valores determinados para cereais e raízes convencionais (12,1%) e uma boa estabilidade durante a cocção, analisada através de determinação de viscosidade (BV);
2. a turbidez das suspensões de amido também apresentou estabilidade durante o armazenamento, assim como a sinerese, que em condições ótimas de preparação do gel apresentou 2,53% de expulsão de água. Em relação à sinerese, o pH da solução e a concentração de amido influenciaram significativamente a capacidade de retenção de água, enquanto a temperatura de formação do gel não se mostrou um parâmetro significativo;
3. a textura das preparações de amido foi influenciada significativamente pela temperatura de formação do gel e pela concentração de amido utilizada na preparação;
4. as etapas de extração e centrifugação são importantes durante o processo de extração do amido de mandioquinha – quanto maior o número de lavagens, maior o isolamento do amido, que foi de 87,8% ao final do décimo estágio de centrifugação;
5. para verificar o grau de pureza do amido nos diferentes ciclos do processo de extração, são necessários estudos complementares, ampliando a observação nos campos microscópios através de uma abordagem estatística;
6. o conhecimento de algumas características reológicas e propriedades físico-químicas do amido de mandioquinha, visando à aplicação como ingrediente alimentício, pode ser uma alternativa à utilização das raízes *in natura*, principalmente no que diz respeito ao excedente de safra e ao aproveitamento das raízes com baixo valor comercial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERA, S., RAKSHIT, S.K. Comparison of physicochemical and functional properties of cassava starch extracted from fresh root and dry chips. *Starch/Stärke*, v.55, p.287-296, 2003.
- ABU-GOUKH, A-B. A., BASHIR, H.A. Changes in pectic enzymes and cellulase activity during guava fruit ripening. *Food Chemistry*, v.83, p.213-218, 2003.
- AFOAKWA, E.O., SEFA-DEDEH, S. Changes in rheological properties and amylase activities of trifoliolate yam, *Discorea dumetorum*, starch after harvest. *Food Chemistry*, v.77, p.285-291, 2002.
- AFOAKWA, E.O., SEFA-DEDEH, S. Chemical composition and quality changes occurring in *Discorea dumetorum* pax tubers after harvest. *Food Chemistry*, v.75, p.85-91, 2001.
- ALAVI, S. Starch research over the years. *Food Research International*, v.36, p.307-308, 2003.
- ALI, Z.M., CHIN. L-H., MARIMUTHU, M., LAZAN, H. Low temperature storage and modified atmosphere packing of carambola fruit and their effects on ripening related texture changes, wall modification and chilling injury symptoms. *Postharvest Biology and Technology*, v.33, p.181-192, 2004.
- ALMEIDA, L.B., PENTEADO, M.V.C. Carotenóides e valor pró-vitâmico da mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorriza* Bancroft.) consumida em São Paulo. *Revista Bioquímica*, São Paulo, v.23, n.1, p.52-57, 1987.
- ALONSO, J., CANET, W., HOWELL, N., ALIQUE, R. Purification and characterization of carrot (*Daucus carota* L) pectinesterase. *Journal of the Science Food and Agriculture*, v.83, p.1600-1606, 2003.
- ALONSO, J., RODRÍGUEZ, M.T., CANET, W. Detection of pectinesterase in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v.16, p.39-42, 1995.

- AMANTE, E.R., NOGUCHI, A., BORGES DE CASTILHO, A., KANZAWA, A., DE FRANCISCO, A. Minimização de resíduos de feculárias de mandioca. In: SEMINÁRIO DEL PROYETO DE INVESTIGACIÓN PRECOMPETITIVA XI.8: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS PARA APLICACIÓN EN ALIMENTOS DE RÉGIMENES ESPECIALES. Baños, Ecuador, 1998, p.23-35.
- ARBAISAH, S.M., ASBI, B.A., JUNAINAH, A.H., JAMILAH, B. Determination of optimum conditions for pectinesterase extraction from soursop fruit (*Anona muricata*) using response surface methodology. *Food Chemistry*, v.55 (3), p.289-292, 1996.
- ARÊAS, J.A.G., LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening: I-the phosphorylase and phosphatase behavior in *Musa acuminata*. *Journal of Food Biochemistry*, v.5, p.19-37, 1981.
- ASSIS, S.A., LIMA, D.C., FARIA DE OLIVEIRA, O.M.M. Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. *Food Chemistry*, v.74, p.133-137, 2001.
- ASSIS, S.A., MARTINS, A.B.G., GUAGLIANONI, D.G., FARIA DE OLIVEIRA, O.M.M. Partial purification and characterization of pectin methylesterase from acerola (*Malpighia glabra* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.4103-4107, 2002.
- AVELAR-FILHO, J.A. Estudo da conservação pós-colheita da mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.). Minas Gerais: Faculdade de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, 1989. 42p. (Dissertação de Mestrado).
- AWAD, M., YOUNG, R.E. Postharvest variation in cellulase, polygalacturonase and pectinmethylesterase in avocado (*Persea americana* Mill, cv. Fuerte) fruits in relation to respiration and ethylene production. *Plant Physiology*, v.64, p.306-308, 1979.
- BARTZ, J.A., ECKERT, J.W. Bacterial diseases of vegetable crops after harvest. In: WEICHMANN, J. **Postharvest physiology of vegetables**. Marcel Dekker, New York, 1987, p.351-376.
- BASSINELLO, P.Z., CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M. Amyolytic activity in fruits: comparison of different substrates and methods using banana as a model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.5781-5786, 2002.
- BELITZ, H., GROSCH, N-D. **Food Chemistry**. Ed. Springer, 1999, p.308-310.

- BENEN, J.A.E., VAN-ALEBEEK, G-J.W.M., VORAGEN, A.G.J. Pectic esterases. In: WHITAKER, J.R., VORAGEN, A.G.J., WONG, D.W.S. **Handbook of food enzymology**. Marcel Dekker, New York, 2003, p.849-856.
- BENEN, J.A.E., VISSER, J. Polygalacturonases. In: WHITAKER, J.R., VORAGEN, A.G.J., WONG, D.W.S. **Handbook of Food Enzymology**. Marcel Dekker, New York, 2003, cap.69, p.857-866.
- BENMILLER, J.N., WHISTLER, R.L. Carbohydrates. In: FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**, 3a ed., Marcel Dekker, New York, USA, 1996, 1069p.
- BERMUDEZ, J.J.H. **Valorización de las amiláceas “no cereales” cultivadas en los países andinos: estudio de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de sus almidones y la resistencia a diferentes tratamientos estresantes**. Colombia: Facultad de Ingeniería de Alimentos, Universidad de Bogotá, 1997. 150p (Trabajo de Grado).
- BERNFELD, P. Amylase α - and β . *Methods in Enzymology*, New York, n.1, p.149-154, 1955.
- BONGHI, C., PAGNI, S., VIDRIH, R., RAMINA, A., TONUTTI, P. Cell wall hydrolases and amylase in kiwifruit softening. *Postharvest Biology and Technology*, v.9, p.19-29, 1996.
- BOTONDI, R., CARDARELLI, M. T., MENCARELLI, F. The role of ethylene in regulating cell wall-degrading enzyme activity using antisense ACC-oxidase in cantaloupe melons. *Acta Horticulture*, v. 510, p. 471-478, 2000.
- 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.
- BRITO, B.G., ESPIN, S.M. Evaluación del contenido de almidón total de raíces y tubérculos andino del banco de germoplasma del INIAP-Ecuador. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE ALMIDÓN. Quito, Ecuador, 1996, p.53-59.
- BUESCHER, R.W., TIGCHELAAR, E.C. Pectinesterase, polygalacturonase, Cx-cellulase activities and softening of the rin tomato mutant. *Hortscience*, v.10 (6), p.624-625, 1975.

- CARDARELLI, M., BOTONDI, R., VIZOVITIS, K., MENCARELLI, F. Effects of exogenous propylene on softening, glycosidase and pectinmethylesterase activity during postharvest ripening of aplicots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p. 1441-1446, 2002.
- CASALI, V.W.D., SEDYAMA, M.A.N. Origem e botânica da mandioquinha-salsa. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.19, n.190, p.13-14, 1997.
- CASTALDO, D., QUAGLIUOLO, L., SERVILLO, L., BALESTRIERI, C., GIOVANE, A. Isolation and characterization of pectin methylesterase from apple fruti. *Journal of Food Science*, v.54, n.3, p.653-655, 673, 1989.
- CATI – Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. Disponível em: http://www.cati.sp.gov.br/tecnologias/catiresponde/CR37mandioquinha_salsa.html Acesso em 19 set. 2002.
- CATI – Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. Disponível em: http://www.cati.sp.gov.br/noticias/m_saiunaimprensa_200309oridutividade_sobe.html Acesso em 20 abril 2004.
- CEASA MINAS – Centrais de abastecimento de Minas Gerais AS. Disponível em: http://www.ceasaminas.com.br/usuarios/agroqualidade/MandioquinhaSalsa/msalsamorfologia.jpg&imgrefurl=http://www.ceasaminas.com.br/usuarios/agroqualidade/MandioquinhaSalsa/mandioquinhasalsa.htm&h=457&w=373&sz=45&tbnid=3cNmSr_PfMEJ:&tbnh=123&tbnw=100&start=20&prev=/images%3Fq%3Dmandioquinha%26hl%3DptBR%26lr%3D%26sa%3DG Acesso em 7 Out 2004.
- CEREDA, M.P., coord. **Propriedades gerais do amido**. São Paulo. Fundação Cargil, 2001. v.1, 224p.
- CHAPPLE, C., CARPITA, N. Plant cell walls as targets for biotechnology. *Current Opinion in Plant Biology*, v.1, p.179-185, 1998.
- CHO, Y.K., AHN, H.K. (1999). Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. purification and properties. *Journal of Food Biochemistry*, 23, 577-592.
- CNPH-EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisas de Hortaliças. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/cultivares/Mandioquinha.html#Origem> Acesso em 23 jun 2004.

- 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, n.5, p.425-438, 2001.
- DARRASSE, A., PRIOU, S., KOTOUJANSKY, A., BERTHEAU, Y. PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, 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. In: SHAAD, N.W., JONES, J.B., CHUN, W. p.56-72. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. The American Phytopathological Society, 3a Ed., 2001. Minnesota, USA.
- 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.
- DUARTE, V., DE BOER, S.H., WARD, L.J., OLIVEIRA, A.M.R. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, v.96, p.535-545, 2004.
- DUFOUR, D., BERMUDEZ, J.J.H. Perspectiva de uso de almidones nativos de raíces y tubérculos en relación con sus propiedades específicas. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE ALMIDÓN. Quito, Ecuador, 1996, p.149-158.
- EL-ZOGHBI, M. Biochemical changes in some tropical fruits during ripening. *Food Chemistry*, v.49, p.33-37, 1994.
- ERGUN, M., SARGENT, S.A., FOX, A.J., CRANE, J.H., HUBER, D.J. Ripening and quality responses of mamey sapote fruit to postharvest wax and 1-methylcyclopropene treatments. *Postharvest Biology and Technology*. In Press, 2005.
- FAYYAZ, A., ASIB, B.A., GHAZALI, H.M., CHE MAN, Y.B., JINAP, S. Pectinesterase extraction from papaya. *Food Chemistry*, v.47, p.183-185, 1993.

- FIORI, M., SCHIAFFINO, A. Bacterial stem rot in greenhouse pepper (*Capsicum annuum* L.) in Sardinia (Italy): occurrence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Journal of Phytopathology*, v.152, p.28-33, 2004.
- FLOROS, J.D. The shelflife of fruits and vegetables. In: CHARALAMBOUS, G. **Shelf live studies of food and beverages**. Elsevier, Amsterdam, 1993, p.195-216.
- GARCIA, A.M., WALTER, W.M. Physicochemical characterization of starch from Peruvian sweetpotato selections. *Starch/Starke*, v.8, p.331-337, 1998.
- GEIGENBERGER, P. Response of plant metabolism to too little oxygen. *Current Opinion in Plant Biology*, v.6, p.247-256, 2003.
- GEIGENBERGER, P., FERNIE, A.R., GIBON, Y., CHRIST, M., STITT, M. Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. *Biol Chemistry*, v.381, p.723-740, 2000.
- GLOVER, H., BRADY, C. Purification of three pectin esterases from ripe peach fruit. *Phytochemistry*, v.37, p.949-955, 1994.
- GREENWOOD, C.T., MILNE, E.A. Starch degrading and synthesizing enzymes: a discussion of their properties and action pattern. In: WOLFROM, M.L., TIPSON, R.S. **Advances in carbohydrate chemistry**. Academic Press, New York and London, 1968, v.23, p.305-343.
- GROSS, K.C. A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. *HortScience*, v.17, n.6, p.933-934, 1982.
- GUMMADI, S.N., PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases – a review. *Process Biochemistry*, v.38, p.987-996, 2003.
- GUNARATNE, A., HOOVER, R. Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches. *Carbohydrate Polymers*, v.49, p.425-437, 2002.
- GUZMÁN-MALDONADO, H., PAREDES-LÓPEZ, O. Amylolytic enzymes and products from starch: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v.35 (5), p.373-403, 1995.
- HAGENIMANA, V., SIMARD, R.E., VÉZINA, L.P. Amylolytic activity in germinating sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) roots. *Journal of American Society of Horticultural Science*, Chicago, v.119, p.313-320, 1994.

- HAGENIMANA, V., VÉZINA, L.P., SIMARD, R.E. Sweet potato α - and β -amilases: characterization and kinetic studies with endogenous inhibitors. *Journal of Food Science*, Chicago, v.59, n.2, p.373-377, 1994.
- HAGERMAN, A.E., AUSTIN, P.J. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.34, n.3, p.440-444, 1986.
- HAUBEN, I., MOORE, E.R.B., VAUTERIN, L., STEENACKERS, M., MERGAERT, J., VERDONCK, L., SWINGS, J. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Syst. Applied Microbiology*, v.21, p.384-397, 1998.
- HÉLIAS, V., LE-ROUX, A.C., BERTHEAU, Y., ANDRIVON, D., GAUTHIER, J.P., JOUAN, B. Characterization of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based methods. *European Journal of Plant Pathology*, v.104, p.685-699, 1998.
- HENZ, G.P. Doenças da mandioquinha-salsa e sua situação atual no Brasil. *Horticultura Brasileira*, v.20(2), p.1-16, 2002.
- HENZ, G.P. Métodos de Conservação Pós-colheita de Mandioquinha-salsa. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE A MANDIOQUINHA-SALSA, 5., 1995, Venda Nova do Imigrante, ES. Palestra e Trabalhos Técnicos... Venda Nova do Imigrante: SOB, 1995. p.21-24.
- 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 da mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.10(1), p.56, 1992 – Resumo.
- HENZ, G.P., REIFSCHNEIDER, F.J.B., SANTOS, F.F. Reaction of arracacha genotypes to the root soft rot caused by *Pectobacterium chrysanthemi*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.40 (1), p.95-98, 2005.

- HERMANN, M. Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.) In: HERMANN, M., HELLER, J. Andean roots and tubers: ahipa, arracacha, maca, yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Disponível em: <http://www.cipotato.org/market/ars/ar2002/abstracts/bherm.htm>. Acesso em 15 Jan. 2004.
- HILTON, D.M., PRESSEY, R. Cellulase activity in peaches during ripening. *Journal of Food Science*, v.39, p.783-785, 1974.
- 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, p.194-199, 1982.
- HOOVER, R. Composition, molecular structure and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymers*, v.45, p.253-267, 2001.
- HOU, W.N., JEONG, Y., WALKER, B.L., WEI, C-I., MARSHALL, M.R. Isolation and characterization of pectinesterase from valencia orange. *Journal of Food Biochemistry*, v.21, p.309-333, 1997.
- HYMAN, L.J., BIRCH, P.R.J., DELLAGI, A., AVROVA, A.O., TOTH, I.K. A competitive PCR-based method for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subesp. *atroseptica* on potato tubers. *Letters in Applied Microbiology*, v.30, p.330-335, 2000.
- IEMMA, J. Efeito da radiação gamma 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.
- IKEDIABI, C.O., OTI, E. Some biochemical changes associated with post-harvest storage of white yam (*Discorea rotundata*) tubers. *Journal of Science Food and Agriculture*, v.34, p.1123-1129, 1983.
- IPPA - International Pectin Producers' Association. Disponível em: <http://www.ippa.info/basics/gal-acid.gif> Acesso em 7 set. 2004.
- JACKMAN, R.L., GIBSON, H.J., STANLEY, D.W. Tomato polygalacturonase extractability. *Journal of Food Biochemistry*, v.19, p.139-152, 1995.
- JAVERI, H., WICKER, L. Partial purification and characterization of peach pectinesterase. *Journal of Food Biochemistry*, v.15, p.241-252, 1991.

- JEONG, J., HUBER, D.J., SARGENT, S.A. Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and cell-wall matrix polysaccharides of avocado (*Persea americana*) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v.25, p.241-256, 2004.
- JIANG, C.-M., WU, M.-C, WU, C.-L, CHANG, H.-M. Pectinesterase and polygalacturonase activities and textural properties of rubbery papaya (*Carica papaya* Linn.). *Journal of Food Science*, v.68 (5), p.1590-1594, 2003.
- JIMÉNEZ-BERMÚDEZ, S., REDONDO-NEVADO, J., MUÑOZ-BLANCO, J., CABALLERO, J.L., LÓPEZ-ARANDA, J.M., VALPUESTA, V., PLIEGO-ALFARO, F., QUESADA, M.A., MERCADO, J.A. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of pectate lyase gene. *Plant Physiology*, v.128, p.751-759, 2002.
- JOBLING, S. Improving starch for food and industrial applications. *Current Opinion in Plant Biology*, v.7, p.210-218, 2004.
- JOHNSTON, D. Methodologies for assaying the hydrolysis of cellulose by cellulases. In: WHITAKER, J.R., VORAGEN, A.G.J., WONG, D.W.S. **Handbook of food enzymology**. Marcel Dekker, New York, 2003, 1108p.
- KAHN, V., GOLDSCHMIDT, S., AMIR, J., GRANIT, A. (1981). Some biochemical properties of soluble and bound potato tuber peroxidase. *Journal of Food Science*, 46, 756-764.
- KANELLIS, A.K., SOLOMOS, T., MATTOO, A.K. Changes in sugars, enzymic activity and acid phosphatase isoenzymes profiles of bananas ripened in air or stored at 2.5% O₂ with and without ethylene. *Plant Physiology*, v.90, p.251-258, 1989.
- KANELLIS, A.K., SOLOMOS, T., ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. Suppression of cellulase and polygalacturonase and induction of alcohol dehydrogenase isoenzymes in avocado fruit mesocarp subjected to low oxygen stress. *Plant Physiology*, v.96, p.269-274, 1992.
- KANG, H.W., KWON, S.W., GO, S.J. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovora* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathology*, v.52, p.127-133, 2003.

- KAPOTIS, G., PASSAM, H.C., AKOUMIANAKIS, K., OLYMPIOS, C.M. Storage of tomatoes in low oxygen atmospheres inhibits ethylene action and polygalacturonase activity. *Russian Journal of Plant Physiology*, v.51 (1), p.126-129, 2004.
- KAUR, L., SINGH, N., SODHI, N.S. Some properties of potatoes and their starches II. Morphological, thermal and rheological properties of starches. *Food Chemistry*, v.79, p.183-192, 2002.
- KETSA, S., CHIDTRAGOOL, S., KLEIN, J.D., LURIE, S. Effect of heat treatment on changes in softening, pectic substances and activities of polygalacturonase, pectinesterase and β -galactosidase of ripening mango. *Journal of Plant Physiology*, v.153, p.457-461, 1998.
- KLAVONS, J.A., BENNETT R.D. Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.34, p.597-599, 1986.
- KORNER, B., ZIMMERMANN, G., BERK, Z. Orange pectinesterase: purification, properties and effect on cloud stability. *Journal of Food Science*, v.45, p.1203-1206, 1980.
- KREIG, N.R. Berge's Manual of Systematic Bacteriology. 1984, v.1. Williams & Wilkins, Baltimore.
- LAATS, M.M., GROSDENIS, F., RECOURT, K., VORAGEN, A.G.J., WICHERS, H.J. Partial purification and characterization of pectin methylesterase from green beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.45, p.572-577, 1997.
- LABIB, A.A.S., EL-ASHWAH, F.A., OMRAN, H.T., ASKAR, A. Heat-inactivation of mango pectinesterase and polygalacturonase). *Food Chemistry*, v.53, p.137-142, 1995.
- LEONEL, M., CEREDA, M.P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.22 (1), p.65-69, 2002.
- LOHANI, S., TRIVEDI, P.K., NATH, P. Changes of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Postharvest Biology and Technology*, v.31, p.119-126, 2004.
- LOPES, C.A., HENZ, G.P. Doenças da mandioquinha-salsa. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.19, n.190, p.49-51, 1997.

- LY-NGUYEN, B., LOEY, A.M.V., FACHIN, D., INDRAWATI, I.V., HENDRICKX, M.E. Partial purification, characterization and thermal and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.5437-5444, 2002A.
- LY-NGUYEN, B., LOEY, A.V., FACHIN, D., VERLENT, I., HENDRICKX, I.M. Purification, characterization, thermal and high pressure inactivation of pectin methylesterase from bananas (cv Cavendish). *Biotechnology and Bioengineering*, v.78 (6), p.683-691, 2002B.
- MA, W.H., BARRET, D.M. Effects of raw materials and process variables on the heat penetration times, firmness and pectic enzyme activity of diced tomatoes (HALLEY BOS 3155 CV). *Journal of Food Processing and Preservation*, v.25, p.123-136, 2001.
- MADHUSUDHAN, B., SUSHEELAMMA, N.S., THARANATHAN, R.N. Studies on sweet potato. Part II: isolation and characterization of starch. *Starch/Stärke*, v.44, p.163-166, 1992.
- MARÍN-RODRÍGUES, M.C., ORCHARD, J., SEYMOUR, G.B. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, v.53, p.2115-2119, 2002.
- MARÍN-RODRÍGUES, M.C., SMITH, D.L., MANNING, K., ORCHARD, J., SEYMOUR, G.B. Pectate lyase gene expression and enzyme activity in ripening banana fruit. *Plant Molecular Biology*, v.51, p.851-857, 2003.
- MATOS DA VEIGA, E. Caracterização e purificação parcial de α -amilase de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2002. 88p. Dissertação de Mestrado.
- McCLEARY, B.V., SHEEHAN, H. Measurement of cereal α -amylase: a new assay procedure. *Journal of Cereal Science*, v.6, p.237-251, 1987.
- MORRISON, W.R., LAIGNELET, B. An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches. *Journal of Cereal Science*, v.1, p.9-20, 1983.
- MOSTOFI, Y., TOIVONEN, P.M.A., LESSANI, H., BABALAR, M., LU, C. Effects of 1-methylcyclopropene on ripening of greenhouse tomatoes at three storage temperatures. *Postharvest Biology and Technology*, v. 27, p.285-292, 2003.

- NAGEL, C.W., PATTERSON, M.E. Pectic enzymes and development of the pear (*Pyrus communis*). *Journal of Food Science*, v.32, p.294-297, 1967.
- NAKANIWA, T., TADA, T., TAKAO, M., SAKAI, T., NISHIMURA, K. Na in vitro evaluation of a thermostable pectate lyase by using error-prone PCR. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.27, p.127-131, 2004.
- NCBI – National Center of Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html> Acesso em 1 ago. 2005.
- NELSON, N.A. Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, v.153, p.375-380, 1944.
- NKALA, D., SIBANDA, S., TOMASIK, P., PALASINSKI, M. isolation and properties of starch from wild yam from Zimbabwe. *Starch/Starke*, v.46, n.3, p.85-88, 1994.
- NODA, T., TSUDA, S., MORI, M., TAKIGAWA, S., MATSUURA-ENDO, C., SAITO, K., MANGALIKA, W.H.A., HANAOKA, A., SUZUKI, Y., YAMAUCHI, H. The effect of harvest dates on the starch properties of various potato cultivars. *Food Chemistry*, v.86, p.119-125, 2004.
- NOGATA, Y., OHTA, H., VORAGEN, A.G.J. Polygalacturonase in strawberry fruit. *Phytochemistry*, v.34, n.3, p.617-620, 1993.
- NUNAN, K.J., DAVIES, C., ROBINSON, S.P., FINCHER, G.B. Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. *Planta*, v.214, p.257-264, 2001.
- NÚÑES-SANTIAGO, M.C., BELLO-PÉREZ, L.A., TECANTE, A. Swelling-solubility characteristics, granule size distribution and rheological behavior of banana (*Musa paradisiaca*) starch. *Carbohydrate Polymers*, v.56 (1), p.65-75, 2004.
- OCAMPO, M.L.A., LOZANO, S.E., ERRASQUIN, R.A., APARICIO, A.J., ORTÍZ, G.D. Softening and biochemical changes of sapote mamey fruit (*Pouteria sapota*) at different development and ripening stages. *Journal of Food Biochemistry*, v. 27, p.91-107, 2003.
- OHNISHI, M., HIROMI, K. In: **Handbook of amylases and related enzymes, their sources, isolation methods, properties and applications**. The Amylase Research Society of Japan, Pergamon Press: Oxford, 1988, p.10-12
- OKUDA, K., NAKA, K-I., SHIMOJO, N. In: **Handbook of amylases and related enzymes, their sources, isolation methods, properties and**

- applications.** The Amylase Research Society of Japan, Pergamon Press: Oxford, 1988, p.178-185.
- OLUOHA, U., UGOCHUKWU, E.N. (1995). Comparison of structure and kinetic mechanism of phosphorylase forms isolated from water yam (*Discorea alata*) and White yam (*Discorea rotundata*) tubers. *Phytochemistry*, 40 (3), 677-684.
- PADMAJA, G., BALAGOPAL, C. Cellular and extracellular enzymes associated with the post-harvest deterioration of cassava tubers. *Journal of Food Science and Technology*, v.22, p.82-87, 1985.
- PARKER, R., RING, S.G. Aspects of the physical chemistry of starch. *Journal of Cereal Science*, v.34, p.1-17, 2001.
- PATHAK, N., MISHRA, S., SANWAL, G.G. Purification and characterization of polygalacturonase from banana fruit. *Phytochemistry*, v.54, p.147-152, 2000.
- PATHAK, N., SANWAL, G.G. Multiple forms of polygalacturonase from banana fruits. *Phytochemistry*, v.48, n.2, p.249-255, 1998.
- PAYASI, A., SANWAL, G.G. Pectate lyase activity during ripening of banana fruit. *Phytochemistry*, v.63, p.243-248, 2003.
- PEREIRA, A.S. O valor nutritivo da mandioquinha-salsa. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE A MANDIOQUINHA-SALSA, 5., 1995, Venda Nova do Imigrante, ES. Palestra e Trabalhos Técnicos... Venda Nova do Imigrante: SOB, 1995. p.14-16.
- PERERA, C., HOOVER, R. Influence of hydroxypropylation on retrogradation properties of native, defatted and heat-moisture treated potato starches. *Food Chemistry*, v.64, p.361-375, 1999.
- 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.
- PÉREZ, E.E., BREENE, W.M., BAHNASSEY, Y.A. Gelatinization profiles of Peruvian carrot, cocoyam and potato starches as measured with Brabender Viscoamylograph, rapid visco-analyzer, and differential scanning calorimeter. *Starch/Starke*, v.50, n.1, p.14-16, 1998.
- PÉREZ, S., KOUWIJZER, M. Shapes and interactions of polysaccharide chains. In: FINCH, P. **Carbohydrates: structures, syntheses and dynamics**. Kluwer Academic, Boston, 1999, 334p.

- PÉROMBELON, M.C.M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology*, v.51, p.1-12, 2002.
- PESIS, E., FUCHS, Y., ZAUBERMAN, G. Cellulase activity and fruit softening in avocado. *Plant Physiology*, v.61, p.416-419, 1978.
- PILNIK, W., VORAGEN, A.G.J. The significance of endogenous and exogenous pectic enzymes in food and vegetable processing. In: **Food Enzymology**. P.F. Fox, 1991, cap.7, p.303-336.
- PIRES, T.C.R. Identificação e caracterização de enzimas amilolíticas de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.). São Paulo, 2002. 74p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- PIRES, T.C.R., MATOS DA VEIGA, E., FINARDI-FILHO, F. Enzimas amilolíticas de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.22, n.3, p.278-284, 2002.
- PRESSEY, R. Extraction and assay of tomato polygalacturonase. *HortScience*, v.21, n.3, p.490-492, 1986.
- PRESSEY, R., HILTON, D.M., AVANTS, J.K. Development of polygalacturonase activity and solubilization of pectin in peaches during mango ripening. *Journal of Food Science*, v.36, p.1070-1073, 1971.
- PRESSEY, R., WOODS, F.M. Purification and properties of two pectinesterases from tomatoes. *Phytochemistry*, v.31 (4), p.1139-1142, 1992.
- PURI, A., SOLOMOS, T., KRAMER, A. Partial purification and characterization of potato pectinesterase. *Food Chemistry*, v.8, p.203-213, 1982.
- REILLY, P.J. Glucoamylase. In: WHITAKER, J.R., VORAGEN, A.G.J., WONG, D.W.S. **Handbook of food enzymology**. Marcel Dekker, New York, 2003, p.727-738.
- ROE, B., BRUEMMER, J.H. Changes in pectic substances and enzymes during ripening and storage of "keitt" mangos. *Journal of Food Science*, v.46, p.186-189, 1981.
- ROJAS, S.A., GOFF, H.D., SENARATNE, V., DALGLEISH, D.G., FLORES, A. Gelation of commercial fractions of β -lactoglobulina e α -lactoalbumina. *International Dairy Journal*, v.7, p.79-85, 1997.

- ROMEIRO, R.S., SOUSA, R.M., MUCHOVEJ, J.J. Soft rot of Peruvian carrot due to *Erwinia carotovora* in Brazil. *Plant Pathology*, v.37, p.300-302, 1988.
- SANTACRUZ, S., KOCH, K., SVENSSON, E., RUALES, J., ELIASSON, A.-C. Three underutilized sources of starch from the Andean region in Ecuador. Part I. Physico-chemical characterization. *Carbohydrate Polymers*, v.49, p.63-70, 2002.
- SANTACRUZ, S., RUALES, J., ELIASSON, A.-C. Three under-utilized sources of starch from the Andean region in Ecuador. Part II: Rheological characterization. *Carbohydrate Polymers*, v.51, p.85-92, 2003.
- SANTACRUZ, S., SVENSSON, E., KOCH, K., ELIASSON, A.-C., RUALES, J. Physicochemical characterization of three unconventional sources of starch from the Andean region in Ecuador. *Tropical Agriculture*, v.75 (2), p.302-304, 1998.
- SANTOS, F.F. dos. A Cultura da Mandioquinha-salsa no Brasil. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 1997, v.19, n.190, p.5-7.
- SANTOS, F.F., CARMO, C.A.S., VILELA, N.J. Colheita, classificação, embalagem e comercialização. In: SANTOS, F.F., CARMO, C.A.S do, ed. Mandioquinha-salsa: manejo cultural. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998, p.64-79.
- SARIKAYA, E., HIGASA, T., ADACHI, M., MIKAMI, B. Comparison of degradation of α - and β -amylases of raw starch granules. *Process Biochemistry*, v.35, p.711-715, 2000.
- SCHOLS, H.A., VORAGEN, A.G.J. Pectic polysaccharides. In: WHITAKER, J.R., VORAGEN, A.G.J., WONG, D.W.S. **Handbook of food enzymology**. Marcel Dekker, New York, 2003, 1108p.
- SECHENKOVA, S.N., KNIREL, Y.A., SHASHKOV, A.S., AHMED, M., MAVRIDIS, A., RUDOLPH, K. Structure of the α -polysaccharide of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* GSPB 436. *Carbohydrate Research*, v.338, p.2025-2027, 2003.
- SEO, S.T., FURUYA, N., LIM, C.K., TAKANAMI, Y., TSUCHIYA, K. Phenotypic and genetic characterization of *Erwinia carotovora* from mulberry (*Morus* spp.). *Plant Pathology*, v.52, p.140-146, 2003.

- SEYMOUR, T.A., PRESTON, J.F., WICKER, L., LINDSAY, J.A., MARSHALL, M.R. Purification and properties of marsh white grapefruit pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.39, p.1080-1085, 1991.
- SEYMOUR, T.A., PRESTON, J.F., WICKER, L., LINDSAY, J.A., MARSHALL, M.R. SHAAD, N.W., JONES, J.B., CHUN, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. The American Phytopathological Society, 3a Ed., 2001, 373p. Minnesota, USA.
- SINGH, J., SINGH, N. Studies on the morphological, thermal and rheological properties of starch separated from some Indian potato cultivars. *Food Chemistry*, v.75, p.67-77, 2001.
- SINGH, N., SINGH, J., KAUR, L., SODHI, N.S., GILL, B.S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, v.81, p.219-231, 2003.
- SINNER, M., PULS, J. Non-corrosive dye reagent for detection of reducing sugars in borate complex. Ion Exchange Chromatography. *Journal of Chromatography*, v.156 (1), p.197-204, 1978.
- SOMOGYI, M. Notes of sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, v.195, p.19-23, 1952.
- SOUZA, R.M. HENZ, G.P., PEIXOTO, J.R. Incidência de injúrias mecânicas em raízes de mandioquinha-salsa na cadeia de pós-colheita. *Horticultura Brasileira*, v.21 (4), p.712-718, 2003.
- STREET, H.V. Glycoside hydrolases – amylases: measurement of starch-iodine complex. In: BERGMEYER, H. **Methods of Enzyme Analyses**, v.2, second edition, Academic Press, New York, 1974.
- SUCKLING, C.J. **Enzyme chemistry: impact and applications**. Second edition, Ed. Chapman and Hall, 1990, 383p.
- TAKAHATA, Y., NODA, T., SATO, T. Changes in carbohydrates and enzyme activities of sweetpotato lines during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.43, p.1923-1928, 1995.
- TESTER, R.F., KARKALAS, J., QI, X. Starch – composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, v.39, p.151-165, 2004.
- THIBAUT, J.F., RALET, M.C. Pectins, their origin, structure and functions. In: McCLEARY, V., PROSKY, L. **Advanced Dietary Fibre Technology**. Blackwell Science, London, 2001, cap.32, p.369-378.

- TIJSKENS, L.M.M., WALDRON, K.W., NG, A., INGHAM, L., VAN DIJK, C. The kinetics of pectin methyl esterase in potatoes and carrots during blanching. *Journal of Food Engineering*, v.34, p.371-385, 1997.
- TOTH, I.K., SULLIVAN, L., BRIERLEY, J.L., AVROVA, A.O., HYMAN, L.J., HOLEVA, M., BROADFOOT, L., PÉROMBELON, M.C.M., McNICOL, J. Relationship between potato seed tuber contamination by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, blackleg disease development and progeny tuber contamination. *Plant Pathology*, v.52, p.119-126, 2003.
- TOVAR, J., MELITO, C., HERRERA, E., RASCÓN, A., PÉREZ, E. Resistant starch formation does not parallel syneresis tendency in different starch gels. *Food Chemistry*, v.76, p.455-459, 2002.
- TRÈCHE, S., AGBOR-EGBE, T. Biochemical changes occurring during growth and storage for two yam species. *International Journal of Food Science and Nutrition*, v.47, p.93-102, 1996.
- VERSTEEG, C., ROMBOUTS, F.M., SPAANSEN, C.H., PILNIK, W. Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinesterases from orange. *Journal of Food Science*, v.45, p.969-971, 998, 1980.
- VILES, F.J., SILVERMAN, L. Determination of starch and cellulose with anthrone. *Analytical Chemistry*, v.21 (8), p.950-953, 1949.
- VILLAVICENCIO, L.E., BLANKENSHIP, S.M., YENCHO, G.C. Skin adhesion in sweetpotato and its lack of relationship to polygalacturonase and pectinmethylesterase during storage. *Postharvest Biology and Technology*, v.32, p.183-192, 2004.
- VORAGEN, A.G.J., PILNIK, W., THIBAUT, J.F., AXELOS, M.A.V., RENARD, C.M.G.C. Pectins. In: STEPHEN, A.M. **Food polysaccharides and their applications**. Marcel Dekker, New York, 1995, 654p.
- VORAGEN, F., BELDMAN, G., SCHOLS, H. Chemistry and enzymology of pectins. In: McCLEARY, V., PROSKY, L. **Advanced Dietary Fibre Technology**. Blackwell Science, London, 2001, cap.33, p.379-398.
- WALKER, D.S., REEVES, P.J., SALMOND, G.P.C. The major secreted cellulase, CelV, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* is an important soft rot virulence factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.7 (3), p.425-432, 1994.

- WEGENER, C.B. Induction of defence responses against *Erwinia* soft rot by endogenous pectate lyase in potatoes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.60, p.91-100, 2002.
- WEGRZYN, T.F., MACRAE, E. Pectinesterase, polygalacturonase and β -galactosidase during softening of ethylene-treated kiwifruit. *HortScience*, v.27, n.8, p.900-902, 1992.
- WHITAKER, J.R. Enzymes. In: FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 3^a ed., Marcel Dekker, New York, USA, 1996, 1069p.
- WHITAKER, J.R. **Principles of enzymology for the food sciences**. Second edition, Ed. Marcel Dekker, New York, 1994, 636p.
- WONG, D.W.S. **Mechanism and theory in food chemistry**. Ed. Van Nostrand Reinhold, New York, 1989, 428p.
- WONG, D.W.S., ROBERTSON, G.H. α -Amilases. In: WHITAKER, J.R., VORAGEN, A.G.J., WONG, D.W.S. **Handbook of food enzymology**. Marcel Dekker, New York, 2003a, p.707-718.
- WONG, D.W.S., ROBERTSON, G.H. β -Amilases. In: WHITAKER, J.R., VORAGEN, A.G.J., WONG, D.W.S. **Handbook of food enzymology**. Marcel Dekker, New York, 2003b, p.719-726.
- YAP, M-N., BARAK, J.D., CHARKOWSKI, A.O. Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70 (5), p.3013-3023, 2004.
- YOSHIDA, O., NAKAGAWA, H., OGURA, N., SATO, T. Effect of heat treatment on the development of polygalacturonase activity in tomato fruit during ripening. *Plant and Cell Physiology*, v.25, n.3, p.505-509, 1984.
- ZAUBERMAN, G., JOBIN-DECOR, M. Avocado (*Persea americana* Mill.) quality changes in response to low-temperature storage. *Postharvest Biology and Technology*, v.5, p.235-243, 1995.
- ZHANG, T., OATES, C.G. Relationship between α -amylase degradation and physico-chemical properties of sweet-potato starches. *Food Chemistry*, v.65, p.157-163, 1999.

ZHANG, Z., WHEATLEY, C.C., CORKE, H. Biochemical changes during storage of sweet potato roots differing in dry matter content. *Postharvest Biology and Technology*, v.24, p.317-325, 2002.

Anexo 1

Figura A – Interação entre os tratamentos (acondicionamento a vácuo e temperatura) para a atividade PE de raízes de mandioquinha, no terceiro dia de armazenamento (ANOVA Fatorial). Variáveis: temperatura: -1 = 25° C (—); +1 = 4°C (---); acondicionamento a vácuo: -1 = raízes não embaladas; +1 = raízes embaladas a vácuo. As letras iguais inseridas no gráfico representam valores estatisticamente semelhantes.

Figura B – Interação entre os tratamentos (acondicionamento a vácuo e temperatura) para a atividade PG de raízes de mandioca, no terceiro dia de armazenamento (ANOVA Fatorial). Variáveis: temperatura: -1 = 25° C (—); +1 = 4°C (---); acondicionamento a vácuo: -1 = raízes não embaladas; +1 = raízes embaladas a vácuo. As letras iguais inseridas no gráfico representam valores estatisticamente semelhantes.

Figura C – Interação entre os tratamentos (acondicionamento a vácuo e temperatura) para a determinação de firmeza (N) na região do xilema de raízes de mandioca, no terceiro dia de armazenamento (ANOVA Fatorial). Variáveis: temperatura: -1 = 25° C (—); +1 = 4°C (---); acondicionamento a vácuo: -1 = raízes não embaladas; +1 = raízes embaladas a vácuo. As letras iguais inseridas no gráfico representam valores estatisticamente semelhantes.

Figura D – Interação entre os tratamentos (acondicionamento a vácuo e temperatura) para a determinação de firmeza (N) na região do floema de raízes de mandioquinha, no terceiro dia de armazenamento (ANOVA Fatorial). Variáveis: temperatura: -1 = 25° C (—); +1 = 4°C (---); acondicionamento a vácuo: -1 = raízes não embaladas; +1 = raízes embaladas a vácuo. As letras iguais inseridas no gráfico representam valores estatisticamente semelhantes.

Figura E – Interação entre os tratamentos (acondicionamento a vácuo e temperatura) para a atividade AM de raízes de mandioquinha, no terceiro dia de armazenamento (ANOVA Fatorial). Variáveis: temperatura: -1 = 25° C (—); +1 = 4°C (---); acondicionamento a vácuo: -1 = raízes não embaladas; +1 = raízes embaladas a vácuo. As letras iguais inseridas no gráfico representam valores estatisticamente semelhantes.

Figura F – Interação entre os tratamentos (acondicionamento a vácuo e temperatura) para o teor de amido total de raízes de mandioca, no terceiro dia de armazenamento (ANOVA Fatorial). Variáveis: temperatura: -1 = 25° C (—); +1 = 4°C (---); acondicionamento a vácuo: -1 = raízes não embaladas; +1 = raízes embaladas a vácuo. As letras iguais inseridas no gráfico representam valores estatisticamente semelhantes.

Figura G – Interação entre os tratamentos (acondicionamento a vácuo e temperatura) para o teor de açúcares redutores de raízes de mandioca, no terceiro dia de armazenamento (ANOVA Fatorial). Variáveis: temperatura: -1 = 25° C (—); +1 = 4°C (---); acondicionamento a vácuo: -1 = raízes não embaladas; +1 = raízes embaladas a vácuo. As letras iguais inseridas no gráfico representam valores estatisticamente semelhantes.