

PECTINA: PROPRIEDADES QUÍMICAS E IMPORTÂNCIA SOBRE A ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR DE FRUTOS DURANTE O PROCESSO DE MATURAÇÃO

Emmanuela P. Paiva^{*}, Marianne S. Lima, Jose A. Paixão

Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.
Correo eletrônico: manukapaiva@hotmail.com

Recebido: Abril 2008; Aceptado: Febrero de 2009

RESUMO

Pectina é um hidrocolóide natural utilizado na indústria de alimentos, bebidas e fármacos devido a sua propriedade funcional geleificante e estabilizante. Este polissacarídeo é um componente multifuncional na parede celular dos vegetais, participando na manutenção da união intercelular, juntamente com a celulose e hemicelulose. Frutas cítricas e tecidos vegetais jovens são suas principais fontes de extração. A interface entre os estudos que envolvem a botânica e a ciência e tecnologia de alimentos desenvolvidos ao longo de 200 anos vem possibilitando o entendimento da composição e funcionalidade dos polissacarídeos pécticos, em nível celular e molecular, o que permitiu uma maior compreensão de sua complexa e fina estrutura e das enzimas envolvidas em sua despolimerização. Estes avanços refletem-se diretamente em maior habilidade na manipulação da pectina desde sua extração, isolamento até a aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: Polissacarídeos pécticos, parede celular, geleificação, firmeza, frutos.

RESUMEN (Revisar El resumen)

La pectina es un hidrocoide natural utilizado en la industria de alimentos, bebidas y fármacos debido a su propiedad funcional como gelificante y estabilizante. Es también un componente multifuncional en la pared celular de las células vegetales, eso toma parte en la conservación del unión intercelular, colectivamente con la celulosa y hemicelulose. Las frutas cítricas y tejidos vegetales jóvenes son sus principales fuentes de extracción. El comunica entre los estudios que implican la botánica y la ciencia y la tecnología de alimentos sustentos desarrollados a lo largo de 200 años viene permitiendo la comprensión de la composición y la funcionalidad del polisacáridos pecticos, en nivel molecular y celular, lo que permitió una comprensión mayor de su complejo y afina estructura y de las enzimas implicadas en su despolimerización. Estos adelantamientos reflejan directamente en la habilidad mayor en la manipulación de la pectina a desde que su extracción, aislamiento hasta la aplicación biotecnológica.

Palabras claves: polisacáridos pecticos, pared celular, gelificar, firmeza, frutos.

INTRODUÇÃO

Pectinas são hidrocolóides naturais presentes em plantas superiores que formam um grupo heteromolecular de polissacarídeos estruturais encontrados na parede celular primária das células vegetais e nas camadas intercelulares (lamela média), contribuindo para adesão entre as células, firmeza e resistência mecânica do tecido [1-3]. A pectina também é determinante na firmeza dos vegetais, característica que se estabelece durante o seu crescimento, amadurecimento, armazenamento e processamento. Naturalmente, a pectina está associada à celulose, hemicelulose e lignina, sendo designada enquanto nesta forma de protopectina, podendo ser extraída com

abundância do mesocarpo da maioria dos frutos cítricos.

A importância da pectina na tecnologia e no processamento de alimentos está associada à sua função de conferir firmeza, retenção de sabor e aroma, bem como ao seu papel como hidrocolóide na dispersão e estabilização de diversas emulsões [5]. A formação de gel é a principal característica funcional da pectina e depende essencialmente das características do meio: pH, teores de sólidos solúveis e cátions divalentes, além de depender dos níveis de pectinas e do seu grau de metoxilação [4,5].

O maior entendimento sobre as propriedades químicas deste polímero, especialmente quando presente ainda na fonte (frutos e hortaliças) vem possibilitando um melhor aproveitamento das suas características específicas, o que se reflete diretamente sobre a qualidade e durabilidade de frutas e vegetais *in natura* ou processados bem como sobre a extração e aplicação das pectinas na indústria alimentícia. Assim a abordagem deste estudo foi orientada sobre a estrutura química e ocorrência da pectina na parede celular, suas interações com os outros constituintes e a influência desta sobre as propriedades geleificantes e firmeza dos frutos.

Pectinas: nomenclatura, função e ocorrência. A fim de padronizar a nomenclatura e facilitar o entendimento das substâncias pécticas, em 1944 o comitê da *American Chemical Society* revisou e definiu estas substâncias complexas como:

- Substancias pécticas: consiste em todos os materiais que contem ácidos poligalacturônico em sua composição.
- Protopectina: Consistem na forma natural da pectina, quando associada à celulose, hemicelulose e lignina. São pouco solúveis em água, e em presença de ácidos diluídos formam os ácidos pectínicos ou pécticos, de diferentes tamanhos moleculares e composição.
- Ácidos pécticos: são cadeias de ácidos galacturônicos totalmente livres de metoxilas e pouco solúveis em água.
- Ácidos pectínicos: termo usado para designar ácidos poligalacturônicos que contém uma proporção insignificante de grupos metil éster.
- Pectina: são ácidos pectínicos solúveis em água, com os grupos carboxilas do ácido galacturônico variavelmente esterificados com metanol [6].

A molécula de pectina pode não estar apenas esterificada por metanol. Em algumas formas, determinados grupos hidroxílicos da cadeia de ácido galacturônico podem estar acetilados e amidados, parâmetro este que define o grau de acetilação e amidação da pectina, respectivamente, que também influencia nas suas propriedades funcionais [7-10].

As substâncias pécticas ocorrem sem exceção na parede celular primária e na lamela média

das células vegetais [1,3,8]. A seiva da planta usualmente contém apenas traços das substâncias pécnicas dissolvidas [1]. Há relatos também da presença de pectinas no citosol da célula vegetal [11].

As pectinas encontram-se naturalmente em associação com a celulose e hemicelulose, que auxiliam na adesão entre as células, sendo considerada a pectina, o principal agente cimentante da parede celular, contribuindo desta forma para firmeza, resistência mecânica e coesividade do tecido [12].

As fontes mais ricas de pectinas estão nos frutos cítricos, podendo ser extraídos em abundância principalmente do albedo, região mesocárpica do fruto. Outra fonte natural deste carboidrato é a maçã, que conjuntamente com os frutos cítricos constituem as principais matérias-primas para produção de pectina em nível comercial [1].

Estrutura química da parede celular e suas interações. A presença de parede celular é uma característica intrínseca as células vegetais. Esta parede se desenvolve em camadas depositadas durante o seu crescimento e senescência. A célula vegetal apresenta parede primária e secundária, e uma lamela média, rica em pectato de cálcio, presente na junção das paredes de células vizinhas. A parede celular primária é formada na fase de crescimento, sendo considerada não-especializada. Enquanto a parede celular secundária forma-se após cessar o crescimento celular, e pode se tornar uma estrutura altamente especializada dependendo de sua localização [13].

Dentre suas maiores funções estão sua essencialidade na maioria dos processos de crescimento, desenvolvimento, manutenção e reprodução, Além de ser responsável por: resistência mecânica das estruturas vegetais; promoção da junção das células; exoesqueleto, controlando a forma e permitindo altas pressões de turgência; e proteção contra agressões físicas e químicas [14].

Os constituintes da parede celular primária e da lamela média podem ser classificados em vários tipos de moléculas poliméricas: polissacarídeos pécnicos, celulose, hemicelulose e proteínas, os quais variam em conteúdo e estrutura química dependendo da espécie de fruto e do estágio de desenvolvimento [15,16].

A celulose é o carboidrato mais abundante na natureza, estando presente em quantidades de 20-40% da matéria seca de todas as plantas superiores. É insolúvel em água e constituído por cadeias lineares que contém três a cinco mil resíduos de D-glicose unidos por ligações β -(1 \rightarrow 4), que constitui o arcabouço esquelético que dá suporte às outras moléculas da parede celular primária. Pode ser encontrada nas formas amorfa e cristalina sendo esta última livre de lignina e hemicelulose. Devido a sua linearidade e a sua natureza estereoregular, as moléculas de celulose se associam entre si formando grandes fibras de policristalinos chamadas de microfibrilas, que são unidas através de pontes de hidrogênio intra e intermoleculares [17,18].

Estas microfibrilas estão circundadas por um número menor de cadeias de celulose e por moléculas de hemicelulose. As microfibrilas são compostas por aproximadamente 20 micelas. As micelas contêm em média 100 cadeias moleculares de celulose. A organização das microfibrilas segue um arranjo pouco ordenado na parede celular primária, sendo frequentemente transversal ao eixo celular e longitudinal aos vértices celulares. Com o envelhecimento celular ocorre a formação das camadas da parede secundária, que confere rigidez a célula, e ainda promove um arranjo definido nas microfibrilas [13].

A hemicelulose é constituída principalmente de xiloglucanas e contribuem com aproximadamente 20-25% dos constituintes da parede celular primária. Em geral, as xiloglucanas estão ligadas a microfibrilas de celulose, pectinas e lignina através de pontes de hidrogênio formando ligações cruzadas que estabilizam a parede celular [15]. Seu esqueleto de açúcares neutros é constituído por ligações β -(1→4) e os resíduos de glicose podem ser substituídos por resíduos de xilose via ligações α -(1→6). O comprimento estimado desta cadeia é de 400-600 nm [16,19].

Pectinas ou poliuronídeos são geralmente considerados polissacarídeos ricos em ácido galacturônico que ocorrem na lamela média e em outras membranas da parede celular. De um modo geral, são constituídas por polímeros lineares de ligações α -(1→4) de ácido galacturônico (aproximadamente 65% da cadeia- domínio homogalacturonana) e resíduos de ramnogalacturonanas I e II, que consistem de unidades de ácido galacturônico alternadas com unidades específicas de ramnose [\rightarrow 4)- α -D-GalA-(1→2)- α -L-Rha-(\rightarrow)]. Nesta região ocorre perda da linearidade, devido a leves dobraduras da cadeia principal. Ainda os resíduos de ramnose carregam outros açúcares como D-galactose, D-arabinose, D-fucose, 2-O-metilfulcose, D-apiose e outros que variam em proporções dependendo da sua fonte [3,16,20].

Os grupos ácidos carboxilas dos monômeros dos ácidos galacturônicos podem ou não estar esterificados com o metanol ou ácido acético, onde a porcentagem dos grupos esterificados é expressa como grau de metoxilação ou acetilação, respectivamente [3,7,21,22]. Os grupos carboxilas esterificados por metanol, podem atingir até 13%, o que significa esterificação de aproximadamente 80%, sendo assim chamadas de pectina de alta metoxilação. A pectina de baixa metoxilação tem os grupos carboxilas esterificados com metanol no máximo 7%, ou seja, grau de esterificação menor que 50% [23].

A fina estrutura química das pectinas pode ser extremamente heterogênea entre as espécies de vegetais, entre tecidos e até mesmo partes do fruto. Resultando na enorme variedade das estruturas dos domínios da pectina (ramnogalacturonana e homogalacturonana) variando desta

forma principalmente o conteúdo e composição dos açúcares, comprimento da cadeia, grau de metoxilação e de acetilação, o que interfere, sobretudo, no rendimento de extração [1,20].

Estruturalmente, as pectinas que participam da constituição da parede celular primária diferem das presentes na lamela média. Na primeira as cadeias de ramnogalaturonana encontram-se altamente ramificada, com longas cadeias de arabinose e galactose ou arabinogalactose. Na segunda as cadeias de ramnogalaturonana apresentam-se ligeiramente ramificadas, com cadeias curtas de arabinose e galactose ou arabinogalactose, contudo, os ácidos galacturônicos da cadeia linear encontram-se altamente esterificados apresentando complexos de ligações com cálcio [16, 24].

Estudos sobre a evolução dos constituintes da parede celular indicam que entre os compostos químicos mais conservados estão à presença da rede de celulose, a presença de certa hemicelulose como xiloglucanas, e a presença de ramnogalacturonana II como um domínio dos polissacarídeos péctico. Entre as características mais modificadas estão à abundância de manose nas cadeias de hemicelulose e a presença de açúcares metilados, o que demonstra um processo de especialização e fortalecimento das interações químicas [25].

Embora seja difícil estruturar um modelo preciso para a parede celular primária, pois este deve refletir as interações entre os diversos componentes, *Albersheim et al*, em 1973 propôs uma arquitetura que vem sendo bastante aceita nos últimos anos [16,26,27].

É aceito que na parede celular primária existam duas fases entrelaçadas: uma fase microfibrilar insolúvel constituída por celulose e certa quantidade de hemicelulose, que confere sustentação, formando sua principal estrutura, onde estão incorporados outros elementos como proteínas (extensina) e glicoproteínas. E uma fase de polímeros não celulósicos que consiste de polissacarídeo (pectinas e xiloglucanas), os quais circundam e embebe o domínio microfibrilar (véase la Figura 1) [16, 27].

As interações entre os componentes podem ser categorizadas em não covalentes e covalentes, e uma rede tridimensional (combinação das duas fases) é capaz de reter água na forma de gel via interações entre as zonas de junção das cadeias de polissacarídeos interespecíficas com regiões dissociadas. Ligações intermoleculares de pontes de hidrogênio e forças iônicas estabilizam estes fatores [26,28].

As abundantes zonas de junção, dependendo da composição dos monossacarídeos ou polissacarídeos, seqüências de ligação e comprimento da cadeia, permitem a formação de uma estrutura que é frágil, mas ao mesmo tempo elástica, com firmeza de gel. As regiões de celulose da parede celular são potencialmente capazes de associações inter-cadeia via pontes de hidrogênio. As associações das xiloglucanas e arabinoxilanas com as regiões de celulose também contribuem no

controle dinâmico dos movimentos da parede celular e na firmeza de sua estrutura [16,29].

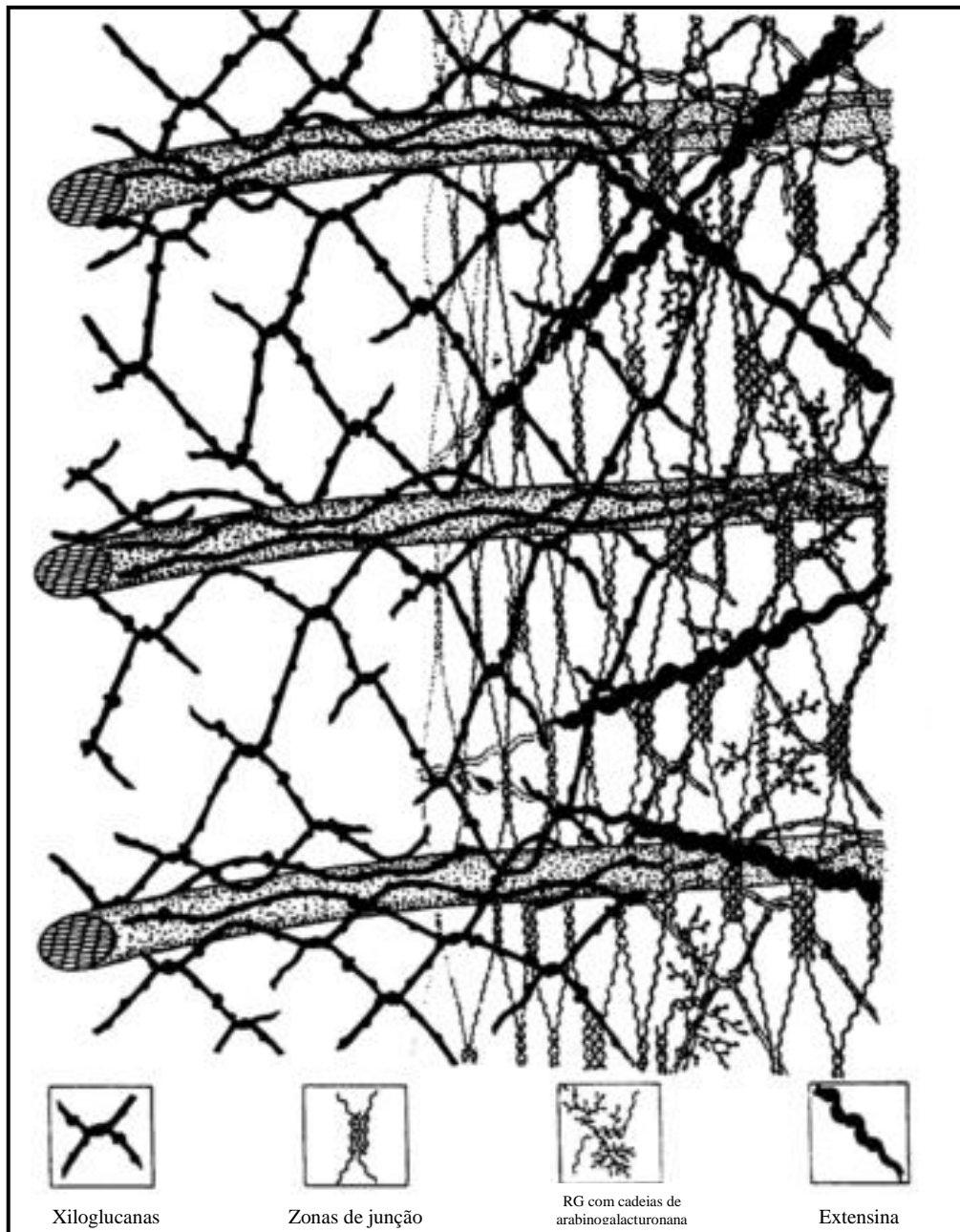


Figura 1. Modelo esquemático para representação da parede celular primária dos frutos. Fonte: Jackman e Stanley [30].

Durante o crescimento, as células se expandem deformando a parede, que ainda retém sua conformação resistindo às pressões de turgência. As microfibrilas de celulose são depositadas em uma orientação direta com a rede de hemicelulose, a qual é enzimaticamente clivada, levando ao afrouxamento da parede de forma a permitir as interações celulose-hemicelulose. Os polissacarídeos não celulósicos, os quais estão embebidos na matriz microfibrilar, ordenam o grau de relaxamento durante a extensão, assim as ligações químicas ou associações são quebradas, e o relaxamento resulta na diminuição da pressão de turgência que é seguido por absorção de água [30].

Esse modelo que descreve a arquitetura da parede celular é concordante com o seu crescimento e foi elucidado através de investigações sobre os mecanismos de expansão. Ele pode facilitar o entendimento e o estudo das relações entre estrutura e firmeza dos frutos, mas ainda é considerado incompleto, já que pouco descreve a atuação da lignina no processo de distensão [16, 30].

Propriedades físicas e mecanismos de formação de geis. As propriedades físicas das substâncias pécticas são atribuídas principalmente à sua estrutura e composição química [31-33]. Neste sentido o grau de metoxilação da pectina e os grupos carboxilas livres (íons carboxilatos) contribuem para o mecanismo de geleificação, sendo a relação $[\text{COOCH}_3:\text{COO}^-]$ o principal indicador das suas propriedades funcionais [37-39]. Géis de pectina originam-se através da formação de ligações cruzadas que dão forma a uma rede cristalina tridimensional onde as moléculas de água e os co-solutos ficam presos e em máxima coalescência [28]. Apesar da relevância deste tópico pouco se conhece da estrutura química das pectinas nos diferentes vegetais.

Na pectina de alta metoxilação, as zonas de junção são formadas por ligações cruzadas do ácido galacturônico por pontes de hidrogênio e forças hidrofóbicas entre os grupos metil. O abaixamento do pH (2,2 a 3,0) e a elevada concentração de açúcares (> 60%) facilita este processo, e induz a redução da solvatação da pectina, aumentando a interação entre as suas moléculas [20,40].

Os grupos carboxilas, particularmente, influenciam na viscosidade e coesividade da solução de pectina, o que por sua vez, depende do grau de esterificação por grupamentos metil deste polímero. Em solução de pectina totalmente esterificada não são observadas mudanças significativas com alterações no pH, portanto à medida que o grau de metoxilação é reduzido a viscosidade torna-se cada vez mais dependente do pH [34].

Aparentemente, os grupamentos carboxilas da pectina de alta metoxilação se ionizam com o aumento do pH. Essa mudança é resultado da repulsão eletrostática entre as cadeias causando maiores interações intermoleculares o que ocasiona aumento na viscosidade e coalescência. Por outro lado, em pectina de baixa metoxilação e em ácidos pécticos a associação entre as moléculas ocorre quando o pH está muito abaixo de 4,0, proporcionando também incremento na viscosidade [1,35].

Outro importante fator que controla a viscosidade e a geleificação, e por conseguinte, a solubilidade das pectinas, é o seu peso molecular, que varia entre 30.000-70.000 kDa em pectina de frutos cítricos [1]. A solubilidade é um parâmetro fortemente influenciado pelas propriedades físico-químicas da pectina, de modo, esta tende a aumentar com o incremento do grau de metoxilação e com a redução do peso molecular da pectina [23]. Estas características direcionam

aplicações industriais e tecnológicas diferenciadas.

Os níveis de pectinas também são um fator importante, sendo necessária sua presença em pelo menos 0,1-1% para que a geleificação ocorra, visto que em quantidades reduzidas, géis frágeis podem ser formados [41]. Por outro lado, em pectinas de baixa metoxilação, a formação do gel envolve ligações simultâneas entre íons de cálcio com grupos carboxilas livres (carboxilatos) formando também uma rede cristalina [9,28,42,43].

As propriedades físicas das moléculas de pectina as tornam um ingrediente importante e bastante utilizado pela indústria alimentícia para aumentar a viscosidade de soluções, e principalmente assumindo papel de hidrocolóide na função de dispersante e estabilizante de diversas emulsões de carboidratos e de proteínas em formulações e alimentos naturais, e na produção de geléias [4,5,36], que incrementa via de regra, valor agregado e tecnológico aos frutos.

Avaliação das condições de extração e grau de metoxilação. A extração da pectina é continuamente estudada ao longo dos anos em consequência de sua importância comercial [44-46] não somente para a indústria de alimentos [36] e fármacos [47,48], mas também em cosméticos, materiais de limpeza e revestimentos biodegradáveis [36].

O processo de extração de pectinas se fundamenta em três etapas básicas: extração ácido-aquosa do material vegetal; precipitação do líquido extraído e, isolamento da pectina [50,51].

Mc Cready em 1970 [1] e outros pesquisadores mais recentes, tais como *Levigne et al* [7] reportam que a condição de extração tem efeitos não apenas na extração propriamente dita [7, 52], mas também no rendimento e na estrutura química do material extraído [33,50,53].

O procedimento de extração da pectina pode ocorrer mediante a ação de ácidos de origem orgânica e inorgânica, e de álcalis. O processo de extração em meio básico rende pectinas de baixa metoxilação, como resultado da saponificação dos grupos ésterer [50]; bem como redução no comprimento da cadeia do galacturônico por beta eliminação. Entende-se que ocorre uma despolimerização do ácido pectínico, dificultando a etapa de filtração durante a extração [54].

Entretanto a extração ácida oferece maiores rendimentos (até 20%) em pectina de alta metoxilação [7], simulando o que ocorre naturalmente nos frutos. Esta situação é preferível e mais usada pelos pesquisadores pelo fato de não promover mudanças abruptas na fina estrutura do polissacarídeo permitindo uma caracterização mais confiável [50], do ponto de vista físico e químico.

No processo de extração ácida, o material é tratado com ácido a temperaturas entre 70 e 100°C por tempos suficientes para remover quantidades de pectinas, que reproduzam condição de extração exaustiva sem perdas da natureza química da pectina [3, 50].

Diversas propostas têm sido abordadas visando definir o pH inicial de extração da pectina, a fim de garantir maiores rendimentos. É notadamente reconhecido que a redução do pH inicial de extração permite obter melhores rendimentos, sendo esta a forma mais conveniente para aplicação em escala industrial [33,50,52]. Porém, a redução extrema pode ser desfavorável, visto que pode acelerar a degradação do polímero e a desesterificação da pectina [4,21].

A pectina é facilmente precipitada mediante a presença de solventes orgânicos ou co-solventes. Os alcoóis usualmente empregados são o etanol e o metanol devido à insolubilidade das substâncias pécticas nestes solventes [51], enquanto o isopropanol é recomendado por *Kalapathy* e *Proctor* [52]. Cloreto de alumínio também pode ser utilizado, precipitando as pectinas por *salting out* [50].

A pectina precipitada é prontamente separada da solução por filtração a vácuo, sendo necessárias lavagens sucessivas com acetona ou álcool para retirada das impurezas, tais como, pigmentos, sólidos solúveis e outros presentes no material co-extraído com a pectina [33,50]. Em seguida utiliza-se uma membrana porosa adequada (material filtrante) que retenha o gel formado. Neste ponto, a pectina encontra-se isolada, sendo necessária para sua purificação uma etapa adicional de centrifugação e filtração em membranas especiais de 3 -11µm [21].

O grau de metoxilação é um elemento chave para a aplicabilidade das pectinas na indústria, uma vez que interfere nas propriedades funcionais desta molécula, principalmente na sua habilidade em geleificar.

Inúmeros são os métodos disponíveis para a determinação do grau de metoxilação da pectina. O mais comumente utilizado pela indústria de alimentos é o método proposto pelo *Food Chemical Codex* (1981). Este método envolve titulação da suspensão de pectinas com hidróxido de sódio antes e depois da saponificação da pectina suspensa. Contudo, para aplicação desta metodologia há a necessidade de grandes quantidades de amostra de pectina (100-500 mg), o que se torna um inconveniente quando se analisado em larga escala.

Outro método para a determinação do grau de metoxilação da pectina envolve a sua desesterificação e determinação do metanol a fim de quantificar a metoxilação. *Wood* e *Siddiqui* [55] usaram o procedimento colorimétrico para análise do conteúdo do metanol através de sua oxidação a formaldeído com permanganato de potássio, seguido pela condensação com 2,4-pentanediona e amônia para gerar um produto de cor o 3,5-diacetil-1,4-diidro-2,6-dimetilpiridona.

Da mesma forma, há métodos instrumentais, sem derivação, que vêm sendo muito utilizado recentemente para esta finalidade, como a cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE [2,7,56,57] e espectroscopia de infravermelho com transformada de *Fourier* [39,58-60], que tem a

vantagem de serem mais rápidos, precisos e não requerer hidrólise prévia, mesmo que necessitem de amostras isoladas de pectina [38].

De acordo com *Manrique e Lajolo* [61], a espectroscopia de infravermelho é uma técnica apropriada para caracterizar as bandas da pectina que ajudam na quantificação do seu grau de metoxilação, devido à localização diferencial das bandas de absorção originadas por modalidades vibracional específica dos grupos dos átomos do ácido galacturônico (R-COOH) e do metil éster (R-COOCH₃). As bandas de interesse para quantificação do grau de metoxilação são 1.650 cm⁻¹ e 1.750 cm⁻¹. A primeira corresponde à vibração dos íons carboxilato, e a segunda, aos ácidos carboxílicos na sua forma esterificada, a partir da localização destas bandas se permite a determinação do grau de metoxilação da pectina.

Transformações da pectina durante o processo de maturação e sua influência a textura de frutos. A firmeza é considerada um dos principais atributos que garantem a qualidade e a aceitabilidade de frutos *in natura* e de seus produtos industrializados. Os estudos dos eventos moleculares responsáveis pelas maiores mudança nos frutos durante o processo de maturação demonstram que a firmeza pode exercer um efeito cooperativo sobre outros atributos sensoriais como aroma, cor, sabor. Pode ainda influenciar na aceitabilidade, vida-de-prateleira, capacidade de transporte, resistência ao cisalhamento e ao ataque por insetos, bactérias e fungos [24,62].

Inúmeros trabalhos têm se dedicado a elucidar os mecanismos responsáveis pelas mudanças na firmeza que ocorrem durante a pós-colheita. Até o momento acredita-se que estas alterações são conseqüências das modificações dos polissacarídeos da parede celular, principalmente na pectina e na hemicelulose. A pectina, durante o amadurecimento, sofre solubilização, despolimerização e desmetoxilação, e assim como a celulose e a hemicelulose é susceptível a hidrólise química e/ou enzimática com subseqüente produção de oligossacarídeos de diferentes tamanhos e composição [61, 63, 64, 66,].

Os polissacarídeos pécticos são os principais constituintes da lamela média e sua degradação é um dos eventos mais notáveis durante o amadurecimento e amolecimento dos frutos. O aumento da solubilidade e despolimerização da pectina tem sido observado durante o amadurecimento da maioria dos frutos [15, 24, 63, 65]. Não existe um padrão de ação enzimática durante a maturação, assim sua influência na firmeza varia enormemente entre os frutos [66].

Para um melhor entendimento do comportamento enzimático *Jayani et al.* [6] classificou as enzimas pectinolíticas em três grupos, a saber: 1-protopectinases: degradam as protopectinas insolúveis e aumentam a solubilização dos polímeros de pectina; 2-esterases: catalisam a desesterificação de pectinas por remoção dos ésteres de metoxil; 3-depolimerases: catalisam a

hidrólise das ligações glicosídicas α -(1→4) do ácido D-galacturônico.

Esta última pode ser subdividida em quatro categorias dependendo da preferência das enzimas sob o substrato, mecanismo de clivagem e local de quebra da ligação glicosídica. Assim a poligalacturonase e polimetilgalacturonase quebram pectatos em pectinas ambos por mecanismos de hidrólise. Entretanto poligalacturonase liase e polimetilgalacturonase liase quebram pectatos em pectinas por β -eliminação e dependendo do padrão de ação, aleatório ou terminal, estas enzimas são terminalizadas como endo- ou exo-, respectivamente [6].

Com o processo de maturação ocorre um aumento da pectina solúvel, ácidos pécticos e pectato de cálcio, o qual é normalmente acompanhado da diminuição da protopectina, indicando que as pectinas solubilizadas são originadas de polímeros mais firmemente integrados a parede celular e possivelmente também a hemicelulose. O aumento na solubilização e despolimerização é geralmente correlacionado com a diminuição da firmeza do tecido e conseqüentemente considerado parte importante do processo de maturação [15].

A poligalacturonase-PG é considerada elemento chave na despolimerização da maioria dos frutos. Ela atua clivando as ligações endo- e exo- α -(1→4) dos ácidos galacturônicos, e sua atividade aumenta significativamente durante o amadurecimento levando a diminuição de tamanho e massa molecular das pectinas e ácido pécticos [63,67].

A PG assume isoformas diferenciadas de acordo com o tipo de fruto. No abacate [68] ela se apresenta com duas subunidades, uma de 46 kD e a outra com 48 kD, já no tomate [67], PG é conhecida como PG2A (43 kD) e PG2B (46 kD). Estas exibem uma atividade máxima em pH 5,5-6,0 e 4,5 respectivamente. A PG obtida de tomate tem atividade específica para as cadeias de ácido poligalacturônico seis vezes maior que a de abacate sendo também quatro vezes mais ativa na liberação de unidades de ácido urônico da parede celular dos frutos [67].

Inicialmente a maioria dos trabalhos utilizou o tomate como modelo para o estudo dos processos de maturação. Neste ocorre uma acentuada atividade da PG especificamente a endo-PG que tem capacidade de solubilizar a maior parte das pectinas, e assim, passou-se a considerar que esta seria a principal enzima responsável pelo amolecimento. Entretanto em experimentos com frutos transgênicos, nos quais o acúmulo de RNAm da PG foi suprimido, o amolecimento dos frutos ainda foi observado [72]. Em outros frutos como maçã [69] e framboesa [70] a atividade a PG é menor ou ausente, e mesmo assim é verificado a solubilização e degradação das pectinas durante o processo de maturação[71].

Em experimentos, nos quais se utilizaram a PG purificada de frutos como abacate [68], tomate [72] e mamão [65], verificou-se que as pectinas despolimerizadas por ação da PG tinham

maior massa molecular em relação às pectinas de frutos que amadurecem naturalmente, indicando que a formação de polímeros de baixo peso molecular é dependente da atuação de outras enzimas. Mesmo os frutos em estágio intermediário de amadurecimento são resistentes à ação isolada da PG purificada.

A pectinametilesterase – PME, na maioria dos frutos, pode ser dividida em duas porções (PME I e PME II) as quais têm sido consideradas isoenzimas. Ambas atuam em pH ótimo 8,0, a 35°C e são ativadas por cátions, sendo os mais efetivos os cátions divalentes como Mg^{2+} [73].

Tem sido proposto [74] que a metilesterificação pode impedir a degradação das pectinas mediada por PG na parede celular de alguns frutos, e que uma parcial desesterificação por PME é necessária para que a PG possa realizar uma contínua despolimerização. Portanto o grau de metilesterificação das pectinas pode ser um fator de regulação do processo de maturação [15,75].

A existência de frutos que mantêm sua polpa endurecida depois de completado o tempo de amadurecimento, também demonstra a existência de substâncias inibidoras da atividade da PME. Entre as substâncias inibitórias pode-se destacar a sacarose, maltose e glicose através de inibição não competitiva, e alguns peptídeos por competição aos sítios de ligação da PME. A causa do não amolecimento da polpa de alguns frutos tem sido relacionada a falhas na desmetoxilação o que, mais uma vez, diminuiu a ação da PG [75].

Karakurt e Huber [76] verificaram que a PG e PME do mamão papaya atuam de forma diferente no fruto inteiro ou cortado. A PG influenciou no total de pectinas hidrossolúveis e no tamanho molecular das mesmas, de forma mais intensa nos frutos cortados, enquanto a PME em frutos inteiros ou cortados teve o mesmo nível de atividade, e embora a metil esterificação diminua durante o amadurecimento os resultados sugerem que os níveis de PME podem ter influência indireta no amadurecimento e mudanças na firmeza do mamão papaya.

A β -galactosidase (EC. 3.2.1.23) e a α -galactosidase (EC 3.2.1.22) vêm adquirindo destaque entre as enzimas que atuam em paralelo a ação PG e PME, já que os resíduos galactosil representam os maiores açúcares neutros da parede celular perdidos durante a maturação da maioria dos frutos. Contudo os efeitos da desgalactosilação da pectina ainda não estão completamente compreendidos para todos os frutos. No abacate [68] e no melão [77] pode ter efeito direto na diminuição da massa molecular dos isolados de pectinas obtidos nos diferentes estádios de maturação.

Em mamão papaya a α -galactosidase está fortemente correlacionada com a perda de firmeza do fruto. Acredita-se que ela pode ter atividade de trans-glicosilação, uma propriedade catalítica que é revelada durante as modificações da parede celular no crescimento e desenvolvimento. Seus prováveis substratos são as cadeias de galactanas ou arabinogalactanas que atuam na formação de

ligações cruzadas entre as cadeias de celulose e xiloglucanas [78].

A poligalacturonase liase-PL conhecida como trans-eliminase de pectatos, catalisa a clivagem de pectinas desesterificadas, atuando sobre as ligações cruzadas dos polissacarídeos pécticos. A clivagem por PL requer a presença de íons de cálcio e gera oligossacarídeos com resíduos galacturonosil insaturados. A ação da PL não resulta apenas na degradação da parede celular, mas também na ativação dos sistemas de defesa [69,71].

De fato uma única enzima não parece ser responsável pelo desarrançamento da parede celular e com o advento da biologia molecular, um número considerável de genes tem sido recentemente identificado, demonstrando o papel de algumas das famílias de enzimas relacionadas ao amolecimento dos frutos. Estes estudos estabelecem correlações entre o acúmulo de RNAm e os dados de estado fisiológico e fenótipo. A combinação destas informações moleculares tem sido usada para gerar dados sobre papel fisiológico de cada enzima, seja bloqueando-a ou exacerbando sua expressão [62,69].

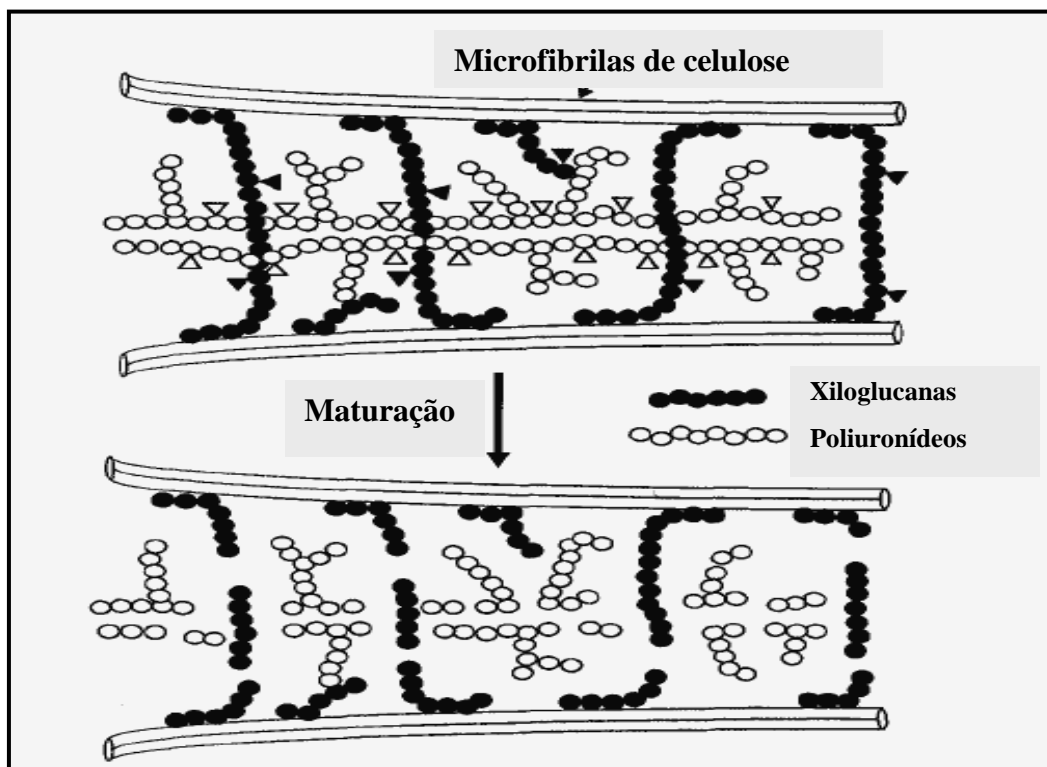


Figura 2. Representação dos eventos de despolimerização dos poliuronídeos e xiloglucanas da parede celular. Triângulos pretos representam a atuação das enzimas sobre as xiloglucanas e celulose e triângulos claros a atuação das hidrolases sobre os polissacarídeos pécticos. Fonte: Wakabayashi [15]a.

Entretanto, o fato das mudanças no RNA poderem prever as modificações a nível enzimático, não garante que o transcrito será necessariamente traduzido e as proteínas detectadas podem não ser necessariamente modificada por mecanismos pós-traducionais e/ou podem não ser totalmente ativas. Além disso, o papel de cada enzima não é totalmente explicado pelos estudos de

uma única isoforma (o que ocorre na maioria dos estudos), já que existe a presença de diversas isoformas com distintos padrões de expressão, o que pode mascarar as atividades individuais em um determinado estágio do desenvolvimento [69,79].

Outros fatores específicos também podem influenciar a atividade enzimática, entre estes pH e a composição iônica do fluido apoplástico. Para tomate [80], maçã [81], kiwi [82], carambola [83] e mamão papaya [63] as condições ideais são as verificadas no fruto em estádios finais de maturação, com pH apoplástico próximo a 4,5 e aumento da permeabilidade aos íons de K^+ .

A Figura 2 é uma representação esquemática dos eventos de despolimerização das pectinas e xiloglucanas durante o amadurecimento, ela representa a intensa degradação e as mudanças na integridade da parede celular, como acidificação, aumento do tamanho dos poros, melhoria na mobilidade das hidrolases da parede celular, remoção de polímeros de caráter adstringente, de ligações metil e acetil [16].

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A versatilidade e diversidade da pectina fazem dela um biopolímero com múltiplas funcionalidades o que justifica sua ampla aplicação. Assim a integração dos conhecimentos nos campos da físico-química, enzimologia e tecnologia de alimentos vêm possibilitando o melhor entendimento e controle dos processos que envolvem seu comportamento sol e gel.

Estas informações podem acrescentar significativamente os estudos de bioquímica pós-colheita, tornando-se ferramentas tecnológicas a ser empregada no aumento da qualidade e durabilidade dos produtos durante o transporte a longas distâncias, vida-de-prateleira, palatabilidade e aceitação pelo consumidor. Possibilitando a abertura e diversificação do mercado econômico, o que aumenta a disponibilidade e a estabilidade de frutas e hortaliças no cenário internacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Mc Cready RM "Pectin". En Joslyn "Methods in food analysis". Nueva York. Academic Press, 10 edición, 1970
- [2] Brandão EM, Andrade CT, *Polím.: Ciên. Tec.*, **1**,38 (1999).
- [3] Mesbahi G, Jamalian J, Farahnaky A, *Food Hydrocolloid*, **19**, 731 (2005)
- [4] Cho YJ, Hwang JK, *J. Food Eng.*, **44**, 85 (2000)
- [5] Gancz K, Alexander M, Corredig M, *Food Hydrocolloid*, **20**, 293 (2006)
- [6] Jayani RS, Saxena S, Gupta SR, *Process Biochem.*, **40**, 2931 (2005)
- [7] Levigne S, Thomas M, Ralet M, Thibault JF, *Carbohydr. Polym.*, **49**, 145 (2002)
- [8] Lootens D, Capel F, Durand D, Nicolai T, Boulenguer P, Langendorff V, *Food Hydrocolloid*, **17**, 237 (2003)
- [9] Capel F, Nicolai T, Durand D, Boulenguer P, Langendorff V, *Food Hydrocolloid*, **20**, 901 (2006)
- [10] Guillotin SE, Van Loey A, Boulenguer P, Schols HA, Voragen AGJ, *Food Hydrocolloid*, **1**, 1 (2006)
- [11] Wu D "The biochemistry of BR". Higher Education Press, 1987
- [12] Zhongdong L, Guohua W, Yunchang G, Kennedy JF, *Carbohydr. Polym.*, **64**, 548 (2006)
- [13] Taiz L, Zeiger E "Fisiologia Vegetal". Artmed: Porto Alegre, 3ª edición, 2006

- [14] Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE “*Biología Vegetal*”. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 6ª edición, 2001
- [15] Wakabayashi K, *J. Plant Res.*, **113**, 231 (2000)
- [16] Brownleader MD, Jackson P, Mobasher A, Pantelides AT, Sumar S, Trevan M, Dey PM, *Crit. Rev. Food Sci.*, **39** (2),149 (1999)
- [17] Van Soest PJ “*Nutritional ecology of the ruminant*”. Oregon. OeB Books, 1982
- [18] Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD “*Molecular biology of the cell*”. Nueva York, Garland Publishing, 1983
- [19] Baumann MJ, Eklof JM, Michel G, Kallas MA, Teeri TT, Czjzek M, Brumer H, *The Plant Cell*, **19**, 1947 (2007)
- [20] Willatsa WGT, Knox PJ, Mikkelsen JD, *Trends Food Sci. Tech.*, **17**, 97 (2006)
- [21] Yapo BM, Robert C, Etienne I, Wathélet B, Paquot M, *Food Chem.*, **100**, 1356 (2007)
- [22] Fishman ML, Chau HK, Hoagland PD, Hotchkiss AT, *Food Hydrocolloid.*, **20**, 1170 (2006)
- [23] Pomeranz Y, Meloan C, *Food Analysis: Theory and Practice*. Nueva York, 3ª edición, 2000
- [24] Manrique GD, Lajolo FM, *Postharvest Biol. Tec.*, **33**, 11 (2004)
- [25] Nothnagel AL, Nothnagel EA, *J. Integr. Plant Bio.*, **49**(8), 1271 (2007)
- [26] Ridley BL, O’Neill MA, Mohnen D, *Phytochemistry*, **57**, 929 (2001)
- [27] Carpita NC, Gilbeaut DM, *Plant Journal*, **3**, 1 (1993)
- [28] Lofgren C, Hermansson Anne-Marie, *Food hydrocolloid.*, **21**, 480 (2007)
- [29] Lazan H, Syu-Yih N, Goh LY, Ali ZM, *Plant Physiol. Bioch.*, **42**, 847 (2004)
- [30] Jackman RL, Stanley DW, *Trends Food Sci Tech.*, **6**, 187 (1995)
- [31] Lin MJY, Sosulski FW, Humbert ES, Downey RK, *Can. J. Plant Sci.*, **55**,507 (1975)
- [32] Kim W , Sosulski FW, Lee CK, *J. Food Sci.*, **43**, 1436 (1978)
- [33] Sahari AL, Akbarian A, Hamed M, *Food Chem.*, **83**, 43 (2003)
- [34] Doesburg JJ “*Pectic Substances in Fresh and Preserved Fruits and Vegetables*”. The Netherlands: IBVT Communication Nr 25, 1965.
- [35] Yoo Sang-Ho, Fishman ML, Hotchkiss JR, Lee, HG, *Food Hydrocolloid.*, **20**, 62 (2006)
- [36] Tabilomunizaga G, Barbosa-Canovas GVJ, *Food Eng.*, **67**,147 (2005)
- [37] Chatjigakis AK, Pappas C, Proxenia N, Kalantzi O, Rodis P, Polissiou M, *Carbohydr. Polym.*, **37**, 395 (1998)
- [38] Sohn MR, Cho RK, *J. Korean Soc. Hort. Sci.*, **41**, 65 (2000)
- [39] Sirisomboon P, Tanaka M, Fujita S, Kojima T, *J. Food Eng.*, **78**, 701 (2007)
- [40] May CD “*Pectins*”. In A. Imeson (Ed.) “*Thickening and gelling agents for food*”. London, Blackie Academic and Professional, 1997
- [41] Kerr WL, Wicker L, *Carbohydr. Polym.*, **42**, 133 (2000)
- [42] Grosso CRF, Bobbio PA, Airoidi C, *Carbohydr. Polym.*, **41**, 421 (2000)
- [43] Cardoso S, Coimbra M, Lopes JA, *Food Hydrocolloid.*, **17**, 801 (2003)
- [44] Panchev IN, Kirtchev NA, Kratchanov C, *Carbohydr. Polym.*, **11**, 193 (1989)
- [45] Minkov S, Minchev A, Paev KJ, *Food Eng.*, **29**, 107 (1996)
- [46] Huang L “*Electron microscope biospecimen preparation technology*”, Nanjing China: Jiangsu Science and Technology Publishing House, 1982
- [47] Yamada H “*Contribution of pectins on health care*”. In J Visser, AGJ Voragen “*Pectins and pectinases*”, Amsterdam, 1ª edición, 1996
- [48] Yamada H, Kiyohara H, Matsumoto T “*Recent studies on possible functions of bioactive pectins and pectic polysaccharides from medicinal herbs*”. In F Voragen, H Schols, R Visser (Editores) “*Advances in pectin and pectinase research*”, Dordrecht, 2003
- [49] Barbosa-Canovas GV, Kokini J L, Ma L, Ibarz A, *Adv. Food Nutr. Res.*, **39**, 1 (1996)
- [50] Joye DD, Luzio GA, *Carbohydr. Polym.*, **43**, 337 (2000)
- [51] Liu Y, Shi J, Langrish TAG, *Chem. Eng. J.*, **1**, 1 (2006)
- [52] Kalapathy U, Proctor A, *Food Chem.*, **73**, 393 (2001)
- [53] Micard V, Thibault JF, *Carbohydr. Polym.*, **39**, 265 (1999)
- [54] Rombouts FM, Thibault JF, *Carbohydr. Res.*, **154**, 177 (1986)
- [55] Wood P, Siddiqui I, *Anal. Biochem.*, **39**, 418 (1971)
- [56] Voragen AG, *Plant physiol.*, **4**, 1781 (2003)
- [57] Plöger, A, *J. Food Sci.*, **57**, 1185 (1992)
- [58] Filippov MP, Korn R, *Zvest.*, **Chem.29**, 88 (1975)
- [59] Boeriu CG, Stolle-Smits T, Van dijk C, *J. Near Infrared Spec.*, **6**, 299 (1998)
- [60] Gnanasambandam R, Proctor A, *Food Chem.*, **68**, 327 (2000)
- [61] Manrique GD, Lajolo FM, *Postharvest Biol. Tec.*, **25**, 99(2002)
- [62] Seymour GB, Manning K, Eriksson EM, Popovich AH, King GJ, *J. Exp. Bot.*, **53**, 2065 (2002)

- [63] Paull RE, Gross K, Qiu Y, *Postharvest Biol. Tec.*, **16**, 79 (1999)
- [64] Shiga TM, Lajolo FM, Filisetti TM, *Ciênc. Tec. Alim.*, **23**, 141 (2003)
- [65] Ali ZM, Chin LH, Lazan H, *Plant Sci.*, **167**, 317 (2004)
- [66] Yashoda H M, Prabha TN, Tharanathan R N, *Carbohydr. Res.*, **340**, 1335 (2005)
- [67] Huber DJ, Karakurt Y, Jeong, J, *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, **13**, 224 (2001)
- [68] Wakabayashi K, Chun JP, Huber DH, *Physiol. Plantarum*, **108**, 345 (2000)
- [69] Goulao LF, Santos J, Sousa I, Oliveira CM, *Postharvest Biol. Tec.*, **43**, 307 (2007)
- [70] Stewart D, Peitro PMI, Davies HV, *Phytochemistry*, **56**, 423 (2001).
- [71] Marín-Rodríguez MC, Orchard J, Seymour GB, *J. Exp. Bot.*, **53**, 2115 (2002)
- [72] Dellapenna D, Lashbrook CC, Toenjjes K, Giovannoni JJ, Fischer RL, Bennett AB, *Plant Physiol.*, **94**, 1882 (1990)
- [73] Lim YM, Chung MCM, *Arch. Biochem. Biophys.*, **307**, 15 (1993)
- [74] Wakabayashi K, Hoson T, Huber DJJ, *Plant Physiol.*, **160**, 667 (2003)
- [75] Jiang C M, Wu M C, Wu C L, Chang H M J, *Food Sci.*, **68**, 1590 (2003)
- [76] Karakurt Y, Huber DJ, *Postharvest Biol. Tec.*, **28**, 219 (2003)
- [77] Villanueva MJ, Tenorio MD, Esteban MA, Mendoza MC, *Food Chem.*, **87**, 179 (2004)
- [78] Soh CP, Ali ZM, Lazan H, *Phytochemistry*, **67**, 242 (2006)
- [79] Giovannoni, J J, *The Plant Cell*, **16**, 170 (2004)
- [80] Almeida DPF, Huber D J, *Physiol. Plantarum*, **105**, 506 (1999)
- [81] Fischer M, Arrigoni E, Amado H, *Carbohydr. Polym.*, **25**, 167 (1994)
- [82] Gallego PP, Zarra I, *Ann. Bot.*, **79**, 695 (1997)
- [83] Chin LH, Ali ZM, Lazan HJ, *Exp. Bot.*, **50**, 767 (1999)