

Bianca D'arck Melo Cavalcante

**AVALIAÇÃO DE MAÇÃS DESCARTADAS DA ESTOCAGEM
SOB REFRIGERAÇÃO COMO FONTES DE ENZIMAS
PECTINOLÍTICAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Profa. Dra. Edna Regina Amante

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Melo Cavalcante, Bianca D'arck
AVALIAÇÃO DE MAÇÃS DESCARTADAS DA ESTOCAGEM SOB
REFRIGERAÇÃO COMO FONTES DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS
/ Bianca D'arck Melo Cavalcante ; orientadora, Edna
Regina Amante, 2019.
83 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos,
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Maças deterioradas.
3. Atividade enzimática. 4. Pectinase. 5. Patulina.
I. Amante, Edna Regina. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência
dos Alimentos. III. Título.

Bianca D'ark Melo Cavalcante

**AValiação de Maçãs Descartadas da Estocagem
sob Refrigeração como Fontes de Enzimas
Pectinolíticas**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 04 de fevereiro de 2019.

Profa. Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Edna Regina Amante
Orientadora

Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero

Profa. Dra. Deise Helena Baggio Ribeiro

Profa. Dra. Maria Manuela Camino Feltes

Profa. Dra. Renata Dias de Melo Castanho Amboni

Dedico este trabalho aos meus pais
Jacicleide e Sandro.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha orientadora, professora Edna Amante muito obrigada por todos os ensinamentos, pela disposição e por sua dedicação. És o meu maior exemplo de pesquisadora e professora, um ser humano de qualidades imensuráveis e que admiro muito.

A banca pela disponibilidade e contribuições.

A Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos (PPGCAL), pela oportunidade de realizar o mestrado e por toda estrutura disponível.

Ao Laboratório de Tecnologia de Frutas e Hortaliças da UFSC, por disponibilizar seu espaço e a maioria dos equipamentos necessários para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Laboratório de Reologia e Biopolímeros da UFSC, em especial à Carol Noronha, por me acompanhar em todas as análises viscosimétricas e ao professor Pedro Barreto, por me ajudar com os cálculos dessa análise.

A professora Eliana Furlong e sua equipe do Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), em especial à Marcy Rodrigues, por realizarem as análises de detecção de micotoxina patulina.

Aos meus parceiros que forneceram as maçãs para o desenvolvimento desse trabalho, principalmente à Cooperserra e ao CEASA.

Aos órgãos financiadores: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES); CNPq UNIVERSAL – MCTI/CNPq 14/2014 - Processo 443244-2014-6; e FAPESC 1233-2014.

Ao LABCAL e ao professor César Damian, por me proporcionarem bolsa de extensão e experiência profissional no Laboratório de Microbiologia durante os primeiros oito meses de mestrado, enquanto eu não era contemplada com a bolsa de dedicação exclusiva.

A todos os professores e colaboradores do departamento, em especial ao Sérgio de Souza, sempre muito disposto a ajudar.

Às minhas colegas de trabalho, Denise Melo e Iria Pedroso, por toda parceria e amizade. Vocês foram muito importantes durante o meu mestrado, enfrentamos muitas barreiras juntas.

Aos meus amigos e familiares, por todo apoio e carinho, vocês foram fundamentais no decorrer de todo esse processo de formação.

A minha irmã Bruna Maylla Melo Cavalcante, que sempre foi muito companheira e por todo seu incentivo. E ao Fernando José Althoff, por todo amor e carinho e, principalmente, por estar sempre ao meu lado.

Em especial, agradeço aos meus pais Sandro José Cavalcante e Jacicleide Xavier de Melo Cavalcante, pelo amor incondicional, por me ensinarem a ser quem eu sou hoje e, principalmente, por acreditarem em mim. Vocês são os maiores responsáveis por eu ter chegado até aqui, essa conquista é nossa.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para esse projeto, muito obrigada!

RESUMO

As maçãs deterioradas são consideradas pelo setor da fruticultura como um resíduo contaminante. Entretanto, os principais fungos responsáveis pela degradação provêm de gêneros produtores de enzimas pectinolíticas (pectinases). O presente trabalho teve como objetivo avaliar a potencialidade de maçãs deterioradas produzidas durante a estocagem, sob refrigeração, como fontes de enzimas pectinolíticas. As maçãs deterioradas, com características de contaminação fúngica (podridão olho-de-boi e mofo azul), bem como maçãs próprias para consumo, foram utilizadas para o preparo das polpas de maçãs dos tipos Fuji e Gala (PF – polpa de maçã Fuji deteriorada, PG – polpa de maçã Gala deteriorada, PCF – polpa controle de maçã Fuji própria para consumo e PCG – polpa controle de maçã Gala própria para consumo). As polpas foram base para elaboração dos extratos enzimáticos (EF, EG, ECF e ECG) correspondentes, e caracterizadas quanto aos teores de sólidos totais, lipídeos, proteínas totais, resíduo mineral fixo, fibra alimentar, sólidos solúveis totais (SST), pH e acidez titulável. Os extratos enzimáticos foram caracterizados quanto ao pH, acidez titulável, SST, proteínas solúveis, micotoxina patulina (PAT) e atividade da pectinase, pelos métodos espectrofotométrico e de redução da viscosidade. Em relação à atividade da pectinase, soluções de pectina a 1 % (m / v) (método espectrofotométrico) e 5 % (m /v) (método viscosimétrico) foram submetidas à hidrólise pelos extratos enzimáticos obtidos de maçãs deterioradas, bem como seus respectivos controles e a enzima de referência, separadamente, a 45, 50 e 60 °C, por 30 minutos, para cada temperatura de hidrólise. Também foi realizada hidrólise por 60 minutos para o método espectrofotométrico. PCF e PCG apresentaram os maiores teores de sólidos totais 16,50 e 15,11 g / 100 g, respectivamente, e PCG apresentou maior teor de resíduo mineral fixo (2,70 g / 100 g). As polpas apresentaram baixo teor de proteína e os teores de fibras alimentares entre 1,10 a 2,30 g / 100 g. PF obteve maior teor de lipídeos (4,04 g / 100 g). PCF e PCG apresentaram maiores teores de SST. Todas as polpas exibiram diferenças significativas ($p < 0,05$) quanto ao pH. PG e PCG não diferiram quanto à acidez e PF apresentou maior valor (10,16 mL / 100 mL). EG apresentou menor pH e maior acidez. Em comparação às polpas, a acidez e os teores de SST dos extratos enzimáticos foram menores. Todos os extratos apresentaram baixos teores de proteína solúvel. EF e EG apresentaram patulina, sendo EF com maior teor (4,57 $\mu\text{g} / \text{L}$). Quanto à atividade da pectinase dos extratos pelo método espectrofotométrico,

após a hidrólise da pectina por 30 minutos, verificou-se que a melhor temperatura foi 45 °C. Já após 60 minutos de hidrólise, a 60 °C EF e EG apresentaram melhor atividade. Contudo, pelo método viscosimétrico, após hidrólise por 30 minutos, os extratos apresentaram melhor atividade a 50 °C. Portanto, as maçãs deterioradas Fuji e Gala apresentam perspectivas para futuros estudos como fontes de enzimas pectinolíticas.

Palavras-chave: Maçãs deterioradas. Caracterização físico-química. Atividade enzimática. Pectinase. Patulina.

ABSTRACT

The damaged apples are considered by the fruit industry as a contaminating residue. However, the main fungi responsible for the degradation comes from genera producing pectinolytic enzymes (pectinases). This study aimed to evaluate the potential of deteriorated apples produced during the storage, under refrigeration, as source of pectinolytic enzymes. The damaged apples with fungal contamination characteristics (Bull's eye rot and blue mold) and apples suitable for consumption were used to prepare apples pulps of the Fuji and Gala types (PF - apple pulp Fuji deteriorated, PG - apple pulp Gala deteriorated, PCF - pulp control of Fuji apple suitable for consumption and PCG - pulp control of Gala apple suitable for consumption). The pulps were used to elaborate the corresponding enzyme extracts (EF, EG, ECF and ECG), and characterized as total solids, lipids, total proteins, minerals, dietary fiber, total soluble solids (TSS), pH and titratable acidity. The enzymatic extracts were characterized as pH, titratable acidity and TTS, as well as evaluated in relation to soluble proteins, mycotoxin patulin (PAT) and pectinase activity by spectrophotometric and viscosity reduction methods. Pectin solutions at 1 % (w/v) and at 5 % (w/v) were hydrolyzed by the extracts obtained from deteriorate apples and their respective controls and the reference enzyme apart, at 45, 50 and 60 °C, for 30 minutes for each hydrolysis temperature. Also, hydrolysis was carried out for 60 minutes to spectrophotometric method. PCF and PCG had the highest total solids contents of 16.50 and 15.11 g / 100 g, respectively, and PCG presented higher fixed mineral residue content (2.70 g / 100 g). The pulps presented low protein content and the content of fiber from 1.10 to 2.30 g / 100 g. PF presented higher lipid content (4.04 g / 100g). PCF and PCG presented higher TSS contents and all pulps showed significant differences ($p < 0.05$) for pH. PG and PCG did not differ as to acidity and PF showed a higher value (10.16 mL / 100 mL). EG had lower pH and higher acidity, but in compare with the pulps the acidity and TSS contents of the enzymatic extracts were lower. All extracts had low levels of soluble protein. EF and EG had patulin, and EF with a higher content (4.57 $\mu\text{g} / \text{L}$). For the pectinase activity of the extracts by the spectrophotometric method, after pectin hydrolysis for 30 minutes, it was observed that the best temperature was 45 °C. After 60 minutes of hydrolysis, at 60 °C EF and EG showed a better pectinase activity. But by viscosimetric method, after hydrolysis for 30 minutes, the extracts showed higher activity at 50 °C. Therefore, the apples deteriorated Fuji

and Gala show perspectives for future studies as sources of pectinolytic enzymes.

Keywords: Deteriorated apples. Physicochemical characterization. Enzymatic activity. Pectinase. Patulin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Distribuição de cultivares por período de colheita de maçãs no Brasil.	5
Figura 2 –	Armazenamento de maçãs em paletes e <i>bins</i> em câmara fria de temperatura e atmosfera controladas.	6
Figura 3 –	Maçãs deterioradas com a epiderme e polpa contaminadas com a podridão olho-de-boi.	8
Figura 4 –	Maçãs deterioradas com características de mofo azul.	9
Figura 5 –	Estrutura química da patulina.	10
Figura 6 –	Fluxograma genérico de produção de enzimas microbianas.	13
Figura 7 –	Padrão das maçãs deterioradas e próprias para consumo (controle) das variedades Fuji e Gala selecionadas para o preparo das polpas.	22
Figura 8 –	Fluxograma de preparo das polpas de maçãs deterioradas e próprias para consumo, dos tipos Fuji e Gala.	23
Figura 9 –	Extratos enzimáticos brutos preparados a partir das polpas de maçãs dos tipos Fuji (EF) e Gala (EG) deterioradas.	24
Figura 10 –	Atividade específica da pectinase nos extratos brutos e da enzima comercial após hidrólise por 30 minutos, através do método de espectrofotométrico (ADNS).	36
Figura 11 –	Atividade específica da pectinase nos extratos brutos e da enzima de comercial após hidrólise por 60 minutos, através do método de espectrofotométrico (ADNS).	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Aplicações das enzimas pectinolíticas em diferentes áreas da indústria.	16
Tabela 2 –	Funções e aplicações das pectinases na indústria de alimentos.	18
Tabela 3 –	Composição físico-química das polpas de maçãs deterioradas e próprias para consumo (controle), dos tipos Fuji e Gala.	29
Tabela 4 –	pH, acidez titulável e teor de sólidos solúveis totais (SST) das polpas de maçãs deterioradas e próprias para consumo (controle), dos tipos Fuji e Gala.	31
Tabela 5 –	pH, acidez titulável, teor de proteínas solúveis (PS) e sólidos solúveis totais (SST) dos extratos brutos obtidos das polpas de maçãs deterioradas e próprias para consumo (controle), dos tipos Fuji e Gala.	33
Tabela 6 –	Atividade específica da pectinase nos extratos brutos em relação à redução da viscosidade do gel de pectina a 5 % (m/v), após hidrólise por 30 minutos a 45, 50 e 60 °C.	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila
ADNS – Ácido dinitrossalicílico
ANOVA – Análise de variância
AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*
AGRIANUAL – Anuário da Agricultura Brasileira
BSA – Albumina do soro bovino
BRDE – Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul
CO₂ – Dióxido de carbono
CEASA – Central de Abastecimento do Estado de Santa Catarina S/A
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD – Detector de arranjo de diodos
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EC – *Enzyme Commission Numbers*
EF – Extrato enzimático bruto obtido de maçã Fuji deteriorada
ECF – Extrato enzimático controle bruto obtido de maçã Fuji própria para consumo
EG – Extrato enzimático bruto obtido de maçã Gala deteriorada
ECG – Extrato enzimático controle bruto obtido de maçã Gala própria para consumo
FS – Fermentação submersa
FMSS – Fermentação em meio semissólido
FES – Fermentação em estado sólido
FAO – *Food and Agriculture Organization*
FDA – *Food and Drug Administration*
γ – Taxa de deformação
H₂O – Água
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IAL – Instituto Adolfo Lutz
JECFA – *Joint Expert Committee on Food Additives*
k – Índice consistência
Kg – Quilograma
L – Litro
LMT – Limites Máximos Tolerados
LOD – Limite de Detecção
LOQ – Limite de Quantificação
mm – Milímetro
min – Minuto
mol – Massa molecular

mL – Mililitro
m/v – Massa/volume
 μm – Micrometro
 μg – Micrograma
 μPa – Micropascal
n – Índice de comportamento do fluxo (adimensional)
N – Nitrogênio
ND – Não detectado
ng – Nanograma
nm – Nanometro
NaOH – Hidróxido de sódio
P – Pectinex Ultra SP-L
PF – Polpa de maçã Fuji deteriorada
PCF – Polpa controle de maçã Fuji própria para consumo
PG – Polpa de maçã Gala deteriorada
PCG – Polpa controle de maçã Gala própria para consumo
Pa – Pascal
PAT – Micotoxina patulina
pH – Potencial hidrogeniônico
PMTDI – Ingestão diária tolerável máxima provisória
PG – Poligalacturonases
PMG – Polimetilgalacturonases
PMGL – Polimetilgalacturonato liase
PGL – Poligalacturonato liase
% – Percentagem
R2 – Coeficiente de determinação
RS – Rio Grande do Sul
R\$ – Real
s – Segundo
SC – Santa Catarina
US\$ – Dólar americano
UV-Vis – Ultravioleta - visível
T – Tensão de cisalhamento
TSS – *Total soluble solids*
v/v – Volume/volume
 \leq – Menor ou igual a
< – Menor que
 \pm – Mais ou menos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.2 OBJETIVOS	2
1.2.1 Objetivo geral	2
1.2.2 Objetivos específicos	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 A MAÇÃ (<i>Malus</i> spp.)	3
2.2 PROCESSO DE CONSERVAÇÃO DE MAÇÃS SOB REFRIGERAÇÃO	4
2.3 PRINCIPAIS DOENÇAS DA MAÇÃ	6
2.3.1 Podridão olho-de-boi	7
2.3.2 Mofo azul	8
2.3.3 Micotoxina patulina	10
2.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS	11
2.4.1 Enzimas microbianas no processamento de alimentos	14
2.5 ENZIMAS PECTINOLÍTICAS	15
2.5.1 Métodos para determinação de atividade da pectinase	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 MATERIAL	21
3.2 MÉTODOS	21
3.2.1 Coleta e transporte das maçãs deterioradas	21
3.2.2 Caracterização das polpas de maçã	23
3.2.3 Obtenção e caracterização dos extratos enzimáticos	24
3.2.3.1 Determinação da acidez titulável	24
3.2.3.2 Determinação do teor de proteínas solúveis	25
3.2.3.3 Determinação de sólidos solúveis totais	25
3.2.3.4 Determinação de micotoxina patulina	25
3.2.3.5 Determinação de atividade da pectinase	26

3.2.4 Análise estatística	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS POLPAS DE MAÇÃ	29
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTOS	32
4.3 DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINA PATULINA NOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTOS	34
4.4 ATIVIDADE DA PECTINASE NOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTOS	35
5 CONCLUSÃO	41
5.1 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	41
REFERÊNCIAS	43
ANEXOS	59
ANEXO A – Certificado de apresentação de trabalho como pôster na VII Semana Acadêmica de Ciência e Tecnologia de Alimentos, intitulado como: “Determinação da atividade enzimática em extratos de maçãs (<i>Malus</i> sp.) pelo método do ácido dinitro 3, 5-salicílico (ADNS)”.	60
ANEXO B – Certificado de apresentação de trabalho como pôster no XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, intitulado como: “Use of deteriorated Fuji apple extract as a potential substrate for pectinolytic enzymes production”.	61
ANEXO C – Declaração de solicitação de registro de Patente, n. 226529, na Secretaria de Inovação da Universidade Federal de Santa Catarina, para Produção de Enzimas.	62
ANEXO D – Declaração de aceite para publicação no livro eletrônico "Avanços e Desafios da Nutrição no Brasil 3".	63

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de maçã apresenta grande relevância para o cenário da fruticultura brasileira, sendo a terceira fruta mais consumida e a oitava produzida no país, em termos de volume (IBGE, 2015; REETZ et al., 2015). A região sul constitui um importante polo produtor de maçãs, sendo responsável por 99 % da produção nacional. Santa Catarina representa 49 % da produção nacional e as principais variedades produzidas são Gala e Fuji (IBGE, 2015).

Apesar do período de safra e colheita de maçã ocorrer, predominantemente, entre os meses de janeiro e maio (KIST et al., 2016), seu consumo ocorre durante todo o ano. Isso se dá graças às condições de conservação pelo frio que mantém as frutas comercialmente disponíveis durante um período maior. Normalmente, a temperatura de armazenamento utilizada em volumes de estocagem individual em contentores (*bins*) é de -1 a 0 °C (GIRARDI; BRACKMANN; PARUSSOLO, 2004). Considerando que permanecem em câmaras frias por longos períodos, é comum observar a existência de frutas degradadas durante a estocagem, sendo que grande parte destas alterações ocorre devido à contaminação por fungos (BRACKMANN et al., 2004; BECKERMAN, 2015).

As variedades de maçã mais populares são particularmente suscetíveis a uma ou mais doenças (BECKERMAN, 2015), sendo os principais micro-organismos contaminantes responsáveis pelas maiores perdas na produção de maçã são *Cryptosporiopsis perennans* e *Penicillium expansum* (BONETI et al., 2006; SANHUEZA, 2004b). Além disso, fungos termorresistentes dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys*, produtores da micotoxina patulina, podem se desenvolver e causar danos à saúde do consumidor (LIU et al., 2003; SCHUMACHER et al., 2006; WELKE et al., 2011).

As enzimas pectinolíticas (pectinases), são produzidas principalmente por fungos filamentosos (gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*) (BOM; FERRARA; CORVO, 2008). Essas enzimas estão relacionadas ao processo de maturação dos frutos e provocam o amolecimento dos tecidos vegetais (UENOJO; PASTORE, 2007). As enzimas pectinolíticas comerciais são obtidas em processos controlados, a partir de micro-organismos selecionados (SANTI; BERGER; SILVA, 2014). Contudo, as maçãs deterioradas são potenciais fontes de enzimas pectinolíticas, uma vez que os fungos responsáveis pela degradação dos

frutos são de gêneros produtores de pectinases (BOM; FERRARA; CORVO, 2008).

Visando contribuir para a valorização das maçãs deterioradas produzidas durante a estocagem, sob refrigeração, o presente trabalho avaliou as perspectivas deste material residual como potencial fonte para a obtenção de enzimas pectinolíticas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar as maçãs deterioradas residuais da estocagem, sob refrigeração, como fonte para a produção de enzimas pectinolíticas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as polpas de maçãs Fuji e Gala e deterioradas próprias para o consumo (controle), estocadas sob refrigeração.
- Obter extratos enzimáticos brutos a partir das maçãs Fuji e Gala deterioradas e próprias para consumo (controle), estocadas sob refrigeração.
- Verificar a presença da micotoxina patulina nos extratos enzimáticos brutos obtidos de maçãs deterioradas, dos tipo Fuji e Gala.
- Determinar o teor de proteínas solúveis dos extratos enzimáticos brutos obtidos de maçãs Fuji e Gala, deterioradas e próprias para consumo (controle) e correlacionar com a atividade enzimática específica.
- Determinar a atividade específica da pectinase nos extratos brutos obtidos de maçãs Fuji e Gala, deterioradas e próprias para consumo (controle), e comparar com a enzima comercial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A MAÇÃ (*Malus* spp.)

A maçã (*Malus* spp.) é uma fruta de clima temperado, conhecida e consumida em diferentes regiões do Brasil e do mundo. Apresenta alto teor de pectina, vitaminas e sais minerais, flavonoides e outros compostos que promovem benefícios à saúde humana (ANDRADE et al., 2009).

O consumo regular de maçã tem sido associado à prevenção de diversas doenças crônicas, tais como doença cardiovascular (SONG et al., 2005), doença pulmonar obstrutiva crônica (GARCIA et al., 2005), câncer de pulmão, câncer de mama (DI PIETRO et al., 2007), entre outros. Além disso, após o consumo de maçã foi observado um aumento significativo da atividade antioxidante no sangue de indivíduos saudáveis (ANDRADE et al., 2009; LOTITO; FREI, 2004; KO et al., 2005).

Segundo Boneti et al. (2006), a macieira surgiu há aproximadamente 25 mil anos na região da Ásia e Oriente Médio, após a última era glacial. Cerca de 7.000 cultivares de maçãs são conhecidos mundialmente, todavia, destacam-se comercialmente Golden Delicious, Red Delicious, Granny, Braeburn, Smith, Pink Lady, Elstar, Fuji e Gala. A produção de Fuji e Gala representa 60 e 30 %, respectivamente, da produção nacional (PETRI et al., 2011).

No Brasil, o cultivo de maçã iniciou na década de 70. Essa produção é de grande relevância para o cenário da fruticultura, sendo a terceira fruta mais consumida e a oitava produzida no país (IBGE, 2017; REETZ et al., 2015). A cadeia produtiva de maçã envolve um complexo sistema de produção, industrialização e comercialização, gerando muitos benefícios socioeconômicos às comunidades e aos estados produtores (BRDE, 2015). A produção tornou-se autossuficiente e ocupa a décima quarta posição mundial, devido à expansão das áreas de plantio e aumento do rendimento (FAO, 2018; KIST et al., 2016). Em 2017 foram produzidas 1.147.782 toneladas de maçã (IBGE, 2017; KIST et al., 2016).

A região sul destaca-se em produção de maçã, uma vez que é responsável por 99 % da produção nacional (IBGE, 2017). Os principais municípios produtores de maçã no Brasil são Vacaria-RS e São Joaquim-SC, seguidos por Fraiburgo-SC, sendo responsáveis por 38, 36 e 18 % da produção total, respectivamente (IBGE, 2015). O estado de Santa Catarina contribui com 49 % da produção nacional, sendo que a atividade está concentrada nas regiões do Meio Oeste e Serra, englobando 41 municípios produtores (IBGE, 2015; IBGE, 2017; PEREIRA; SIMIONI;

CARIO, 2007). Essas regiões são propícias à produção de maçã devido às suas características climáticas e de relevo, nas quais prevalece o clima frio, terrenos planos e/ou de declive. Além disso, a presença de indústrias e cooperativas altamente mecanizadas, com estruturas de processamento e de armazenamento modernas permite a comercialização de maçã durante todo o ano (RECH; CARIO; AUGUSTO, 2014).

Alguns produtos derivados de maçã como sucos, geleias, doces, entre outros são produzidos, normalmente, com frutos que não obtiveram bom desenvolvimento e/ou não apresentam os padrões de qualidade exigidos pelo mercado. Ademais, geram anualmente elevado volume de resíduos (ALBUQUERQUE et al., 2006; MELLO, 2004; VILLAS BÔAS, 2001).

2.2 PROCESSO DE CONSERVAÇÃO DE MAÇÃS SOB REFRIGERAÇÃO

As maçãs são suscetíveis a danos mecânicos, sendo estes muitas vezes responsáveis pela deterioração e redução do valor comercial do produto. Além disso, as maçãs apresentam padrão respiratório climatérico, portanto, continua o processo de maturação após a colheita (KWEON, 2013). Este processo é influenciado pela temperatura na qual são conservadas, sendo que temperaturas mais baixas retardam as alterações bioquímicas e microbiológicas (BRACKMANN et al., 2004; KWEON, 2013).

A produção de maçã ocorre em um curto período do ano (Figura 1), esta condição aliada com a demanda por produtos com qualidade pelo consumidor estimulam o desenvolvimento de novas variedades mais resistentes às doenças, por melhoramento genético, e uso de tecnologias que favorecem a conservação da maçã por um maior período (BRACKMANN et al., 2008; KIST et al., 2016).

Dentre os fatores importantes para a conservação da qualidade dos frutos está a temperatura de armazenamento, uma vez que atua na prevenção ou na diminuição da incidência de doenças e distúrbios fisiológicos (KADER, 2002). Em condições de armazenamento refrigerado, de temperatura e umidade relativa controladas, o período de conservação é de aproximadamente quatro meses (SAQUET et al., 1997). Segundo Reyes (1994), o armazenamento dos frutos a baixas temperaturas auxilia na conservação das maçãs, sendo o período de comercialização de 7 a 14 dias a 20 °C.

Figura 1 – Distribuição de cultivares por período de colheita de maçãs no Brasil.



Fonte: Kist et al. (2016).

Além dos cuidados e da modernização no armazenamento, o pré-resfriamento, quando praticado pelos fruticultores, deve proporcionar a rápida diminuição na temperatura das frutas, sendo considerada uma etapa importante no processo de conservação, pois minimiza o processo respiratório, a perda de água e previne o desenvolvimento de doenças, prolongando a vida útil dos frutos (BRACKMANN et al., 2004). Os principais métodos de pré-resfriamento utilizados para maçã são o resfriamento em câmara fria, ar forçado e água (*hydrocooling*).

No Brasil, é comumente utilizado o pré-resfriamento em água e armazenamento em câmaras frias (Figura 2). Estas devem manter a temperatura constante, caso contrário haverá perda na qualidade das maçãs, uma vez que ocorrerá maior consumo de açúcares e ácidos acumulados (BRACKMANN et al., 2004; BRACKMANN et al., 2008). Além disso, ao prolongar o tempo de armazenamento nas câmaras frias observa-se perda de firmeza na polpa e escurecimento do fruto (BRACKMANN et al., 2008).

Figura 2 – Armazenamento de maçãs em paletes e *bins* em câmara fria de temperatura e atmosfera controladas.



Fonte: Grupo Fischer S/A (2017).

2.3 PRINCIPAIS DOENÇAS DA MAÇÃ

Os alimentos mais propensos à deterioração por fungos são as frutas e os produtos obtidos das mesmas (KOTZEKIDOU, 1997). Sua principal fonte de contaminação é o solo, onde estão presentes a maioria dos fungos (SANHUEZA, 2004a). Contudo, durante a maturação das frutas ocorre o aumento do pH dos tecidos, carboidratos solúveis são formados e as barreiras de defesa enfraquecem, favorecendo assim a ação fúngica (STINSON et al., 1981). Além disso, o manuseio dos frutos de forma indevida pode resultar na destruição interna dos tecidos, promovendo rachaduras e rupturas na camada externa do fruto, facilitando a atuação de micro-organismos e insetos (RESENDE; MACHADO, 2000).

A produção de maçã no Brasil é concentrada em um curto período do ano e por esse motivo, o armazenamento dos frutos é essencial para a continuidade da comercialização durante o ano. Nesse período ocorre a perda de frutos devido ao amadurecimento, desordens fisiológicas, e ao ataque por pragas e patógenos (BRACKMANN et al., 2008; SANHUEZA, 2004a). De modo geral, a deterioração da maçã e seus derivados pode ser caracterizada pelo crescimento visível do fungo, produção de ácido, odor desagradável e ruptura da estrutura dos tecidos vegetais, sendo a última decorrente da ação de enzimas pectinolíticas (GERALDA-SILVA et al., 2005; SANHUEZA, 2004a; UGWUANYI; OBETA, 1999).

As doenças da macieira podem provocar o enfraquecimento das plantas e a morte do pomar, além disso, as frutas tornam-se comercialmente pouco atrativas (KOVALESKI; RIBEIRO, 2003), impactando diretamente na economia da maçã. Segundo Martins et al. (2007), as perdas na pós-colheita são superiores a 20 %.

A podridão olho-de-boi (*Cryptosporiopsis perennans*) e o mofo azul (*Penicillium expansum*) são as doenças pós-colheita que causam as maiores perdas na produção de maçã no Brasil (BONETI et al., 2006; SANHUEZA, 2004b). Além disso, a presença de patulina na maçã é recorrente e de elevada importância, principalmente em termos de segurança para o consumo (WELKE et al., 2011).

2.3.1 Podridão olho-de-boi

A podridão olho-de-boi, como é popularmente conhecida, é uma doença que atinge o pomar e o fruto da maçã (SANHUEZA, 2004a). Está presente em diversas regiões produtoras de maçã no mundo, sendo relatada na Austrália, Brasil, Chile, Estados Unidos, Itália, Polônia e República Tcheca (MICHALECKA et al., 2015; PEŠICOVÁ et al., 2016; SANHUEZA; BOGO, 2015). É considerada a principal doença pós-colheita da maçã, sendo recorrente durante o armazenamento. Na região sul do Brasil, a podridão olho-de-boi é responsável por perdas superiores a 18 % (VALDEBENITO-SANHUEZA; SPOLTI; DEL PONTE, 2010). Além disso, os frutos com essa doença são inviáveis para comercialização *in natura*, dessa forma os lucros obtidos com o cultivo de maçã são menores (ARAÚJO et al., 2016).

O patógeno responsável pela podridão olho-de-boi é o *Cryptosporiopsis perennans*. Este se desenvolve no inverno, em períodos de elevado volume de chuva, sob a temperatura média de 0 a 20 °C. A infecção inicia-se pela epiderme, quando o fruto está em processo de maturação, sem precisar de ferimentos na superfície. Internamente, os tecidos apresentam-se desidratados e com lesão aparente nas áreas da podridão (Figura 3) (ARAÚJO et al., 2016; SANHUEZA, 2004a; SANHUEZA, 2004b).

Figura 3 – Maçãs deterioradas com a epiderme e polpa contaminadas com a podridão olho-de-boi.



Fonte: Sanhueza (2004a).

Em relação às medidas de controle e prevenção da podridão olho-de-boi, incluem a remoção de cancos em ramos e a eliminação de frutos e ramos caídos. A aplicação de luz ultravioleta também pode prevenir a incidência dessa doença nos frutos (ARAÚJO et al., 2016). Além disso, o controle da temperatura no armazenamento e o uso de atmosfera controlada podem retardar a deterioração das maçãs pelo *C. perennans* (SANHUEZA, 2004a; SANHUEZA; BETTI, 2005). O uso de fungicidas cúpricos no inverno e de benzimidazois e protetores em pré-colheita são recomendados para o controle da podridão olho-de-boi (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2006).

2.3.2 Mofo azul

A podridão por *Penicillium* ou mofo azul, como é conhecida, é uma doença pós-colheita que ocorre durante o armazenamento (SANHUEZA, 2004a). O micro-organismo responsável pelo mofo azul é o *Penicillium* spp., sendo a espécie *P. expansum* a mais comum (JONES; ALDWINCKLE, 1990; BRACKMANN et al., 2008). O *Penicillium* spp. pode contaminar as frutas de clima temperado, em condições de temperatura ambiente de comercialização, bem como em temperatura de refrigeração convencional e em atmosfera controlada (AMIRI; BOMPEIX, 2005; MOSTAFAVI et al., 2013; SANHUEZA, 2004b).

A contaminação com *Penicillium* spp. ocorre quando o fruto apresenta fissuras em sua superfície, favorecendo o desenvolvimento do fungo durante a colheita e o manuseio da maçã. O fungo pode ter como origem os resíduos da colheita presente nos *bins* (contentores de frutas) e, os esporos podem estar presentes nos tanques de imersão utilizados na

classificação das maçãs (AMIRI; BOMPEIX, 2005; ARAÚJO et al., 2016). Os *bins* são caixas nas quais as maçãs são transportadas desde os pomares às câmaras frias, onde são empilhados (BRACKMANN et al., 2008).

O mofo azul desenvolve-se rapidamente na maçã, provoca podridão e o amolecimento dos tecidos. A região afetada pelo fungo apresenta uma mancha aquosa e translúcida, com coloração bege ou marrom-claro (Figura 4). Em condições de alta umidade, desenvolvem-se sobre a área afetada manchas brancas e azuis constituídas pelo micélio e esporos do fungo (SANHUEZA, 2004a). Contudo, o mofo azul pode variar de aspecto conforme a cultivar de maçã e período de colheita (ARAÚJO et al., 2016).

Figura 4 – Maçãs deterioradas com características de mofo azul.



Fonte: Sanhueza (2004b).

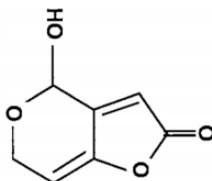
Para minimizar a contaminação é necessário aplicar as Boas Práticas Agrícolas, desde o cultivo à colheita das maçãs, bem como ter o manejo adequado, selecionar os frutos sem fissuras, ter uma boa higienização dos *bins* e, se necessário, aplicar fungicidas com imazalil ou iprodiona após a colheita (ARAÚJO et al., 2016; SANHUEZA, 2004a). Além disso, atuar na prevenção do mofo azul é importante, pois o fungo *Penicillium* spp. é responsável pela produção da micotoxina patulina, que é uma substância mutagênica, de efeito tóxico caracterizado por distúrbios respiratórios e motores, capaz de promover neuro e imunotoxicidade, além de ação teratogênica (BAERT et al., 2007; BRACKMANN et al., 2008; SCUSSEL, 1998).

2.3.3 Micotoxina patulina

As micotoxinas são metabólitos tóxicos secundários produzidos por fungos filamentosos, principalmente dos gêneros *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp., e são capazes de produzir efeitos agudos ou crônicos no organismo humano e animal (BERTHILLER et al., 2007; BERTHILLER et al., 2013; SCUSSEL, 1998).

A patulina (Figura 5), também denominada clavicina, claviformina ou expansina, é uma micotoxina termorresistente da classe hidroxifuropiranona (GARCIA et al.; 2011).

Figura 5 – Estrutura química da patulina.



Fonte: Moake, Padilla-Zahour e Worobo (2005).

Dentre os fungos produtores de patulina destaca-se o *P. expansum*, uma vez que para o seu desenvolvimento elevados níveis de oxigênio não são requisitados, além disso, este fungo pode-se reproduzir em baixas temperaturas (< 5 °C). O *P. expansum* também é responsável por 70 a 80 % da deterioração de frutas armazenadas e, em especial, maçãs (BAERT et al., 2007; LEGGOTT; SHEPHARD, 2001).

Alguns estudos realizados com animais demonstraram que a patulina apresenta efeito carcinogênico, mutagênico e teratogênico, bem como ação imunossupressora (SCHUMACHER et al., 2005; SCHUMACHER et al., 2006). Segundo Scussel (1998), Moake, Padilla-Zahour e Worobo (2005), o efeito tóxico dessa micotoxina é caracterizado por distúrbios motores e respiratórios, espasmos, asfixia, hemorragia no pulmão e cérebro. Além disso, a patulina pode provocar danos hepáticos, uma vez que a toxina inibe o crescimento e a síntese de proteína em cultura de tecido hepático (PUEL; GALTIER; OSWALD, 2010). Em humanos, foram observados distúrbios gastrointestinais, náuseas e vômito devido ao consumo de alimentos contaminados com essa micotoxina, principalmente maçãs e seus derivados (LAI et al., 2000).

O JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives*) estabelece como Limite de Ingestão Diária Tolerável Máxima Provisória (PMTDI) de patulina, 0,4 µg.Kg⁻¹ de peso corpóreo / dia (FDA, 2001). No Brasil,

os Limites Máximos Tolerados (LMT) de patulina em produtos de maçã é de $50 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ (BRASIL, 2011). Devido à sua toxicidade e à possibilidade da presença de patulina ser indicador de segurança em alimentos, a Comissão do *Codex Alimentarius* estabelece como concentração máxima aceitável $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de patulina em suco de maçã (CODEX, 2003). De acordo com o Regulamento (CE) n.º 1881 (2006), na União Europeia, o nível máximo permitido para produtos de maçã destinados a crianças é $10 \mu\text{g.Kg}^{-1}$. Contudo, tais limites são determinados para produtos de consumo direto. Apesar da baixa exposição da população em geral à patulina, grupos específicos, como bebês e crianças, estão mais expostos, pois tendem a consumir mais produtos à base de maçã (DRUSCH et al., 2007).

A produção de patulina pelo fungo ocorre nas partes danificadas da maçã, porém a micotoxina pode difundir na área de tecido sadio de 1 a 2 cm (TANIWAKI et al., 1992; RYCHLIK; SCHIEBERLE, 2001). Fatores como o tamanho das lesões e o tempo em que as maçãs ficam expostas à temperatura ambiente após o armazenamento refrigerado, podem influenciar significativamente a produção da micotoxina (MORALES et al., 2007). Quanto maiores forem as lesões iniciais no fruto, maior é a produção de patulina. Além disso, o armazenamento a 25°C após o período de estocagem a frio propicia o desenvolvimento do tecido danificado e o acúmulo de patulina (AMPARO et al., 2012; WELKE et al., 2009).

2.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS

As enzimas são substâncias orgânicas específicas compostas por polímeros de aminoácidos de natureza proteica, que atuam, principalmente, como catalisadores biológicos de reações químicas (BORZANI et al., 2001; COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Estão envolvidas em diversos processos vitais, uma vez que as reações químicas fundamentais para organismos vivos, como oxidação de glicose a CO_2 , bem como a replicação e transcrição de DNA, na ausência desses catalisadores biológicos ocorrem em velocidades muito baixas (BORZANI et al., 2001; COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

As enzimas aceleram a velocidade de reações químicas, diminuindo a energia de ativação para que essas reações ocorram e estão envolvidas em diferentes processos bioquímicos e metabólicos. Devido à sua complexidade estrutural, possuem alta especificidade (BORZANI et

al., 2001; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; LI et al., 2012). Geralmente, são sintetizadas pelas próprias células onde atuam, além disso, têm concentração celular variável, conforme as condições fisiológicas requeridas e podem ter sua atividade modulada (BORZANI et al., 2001).

Alguns fatores como a concentração de enzima ou de substrato, temperatura, pH e presença de cofatores influenciam na velocidade das reações enzimáticas. Além disso, a atividade enzimática pode variar de acordo com a estrutura da proteína, natureza do substrato e do grupo prostético (LEE; REDFERN; ORENGO, 2007; LI et al., 2012). Em usos industriais as enzimas destacam-se em relação aos catalisadores químicos, devido à sua alta especificidade, bem como às condições brandas de reação, minimizando os gastos energéticos, os prejuízos ambientais e toxicológicos (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

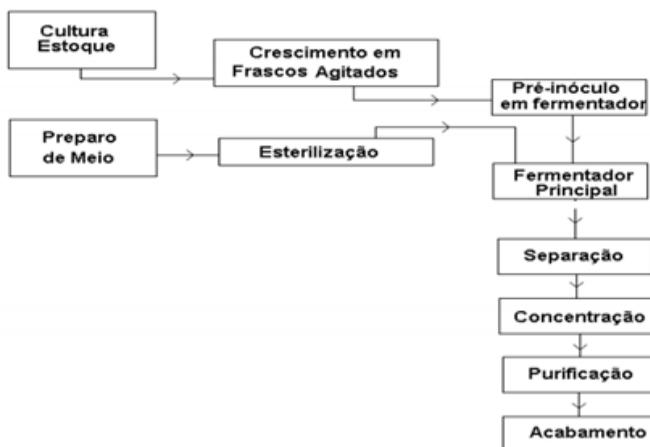
Comercialmente, as enzimas são produzidas a partir de células onde cumprem uma função metabólica (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). As células microbianas são fontes de enzimas, oferecendo vantagens, como a possibilidade de uma maior produção em um menor tempo, relativa facilidade para serem cultivadas em condições controladas e alta sensibilidade às alterações genéticas, o que permite, através de técnicas da biologia molecular e celular, a obtenção de linhagens melhoradas quanto à produção e qualidade da enzima requerida (PANDA et al., 2016).

Os processos fermentativos, cujas etapas estão genericamente descritas na Figura 6, são utilizados para a obtenção de enzimas microbianas (BORZANI et al., 2001; COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). A fermentação ocorre quando os micro-organismos presentes no meio se reproduzem e utilizam uma fonte de nutriente específica, transformando a matéria prima em bioproduto (COURI; DAMASO, 2018). Além disso, o processo de fermentação permite a produção de enzimas com alta produtividade e menor custo (PANDA et al., 2016).

A crescente utilização de enzimas microbianas em processos industriais, bem como as diferenças entre as mesmas, demanda processos variados (DAMASO; COURI, 2019; PANDA et al., 2016). O processo de fermentação pode ser de dois tipos: a fermentação submersa (FS) e a fermentação em meio semissólido ou estado sólido (FMSS ou FES). A fermentação submersa ocorre em meio com presença de água livre e normalmente com substratos solúveis. Já a FMSS ou FES ocorrem na ausência total ou parcial de água livre, onde o crescimento microbiano e a formação de produtos ocorrem na superfície de substratos sólidos (DAMASO; COURI, 2019).

Os processos fermentativos também podem ser classificados quanto ao modo de operação. De acordo com Damaso e Couri (2019), podem ser: 1) batelada, no qual o processo é interrompido para retirada de todo o produto e seu término; 2) batelada alimentada, no qual uma corrente de alimentação é adicionada ao biorreator, sem que efluente e células sejam removidos do sistema; 3) contínuo, ocorre entrada de uma corrente de alimentação e saída de produto durante todo tempo de operação.

Figura 6 – Fluxograma genérico de produção de enzimas microbianas.



Fonte: Adaptado de Coelho, Salgado e Ribeiro (2008).

As enzimas microbianas têm ampla aplicação, são usadas em detergentes, nas indústrias têxteis, de papel e celulose, síntese orgânica e indústria de biocombustíveis, alimentos e rações (LI et al., 2012). Com o avanço dos estudos da produção enzimática, processos de fermentação e recuperação, estima-se o uso crescente de enzimas na indústria (DEWAN, 2016; SINGH et al., 2016). Em relação ao mercado global, estima-se uma taxa de crescimento de 7 % durante o período de 2015 a 2020 para atingir quase US\$ 6,2 bilhões (DEWAN, 2016; SINGH et al., 2016).

2.4.1 Enzimas microbianas no processamento de alimentos

Historicamente, os processos biotecnológicos são praticados há milhares de anos. As antigas civilizações relataram o uso de processos fermentativos para preparação de bebidas alcoólicas, havendo, inclusive, registros bíblicos sobre a fabricação do pão e do vinho (LERESCHE; MEYER, 2006).

As enzimas têm aplicação em diferentes campos, incluindo a fabricação de alimentos, nutrição animal, cosméticos, medicamentos, entre outros. São conhecidas cerca de 4.000 enzimas, sendo que 200 destas têm origem microbiana e apresentam uso comercial, sendo processadas por um pequeno número de empresas, em grande escala, em todo o mundo (LI et al., 2012). Quando comparadas às enzimas de origem vegetal e animal, as enzimas microbianas apresentam vantagens, como relativo baixo custo e menor tempo de produção (NIGAM, 2013).

As enzimas utilizadas no processamento de alimentos promovem alterações desejáveis nas características de um alimento durante o seu processamento (BRASIL, 2014). Em geral, as enzimas são consideradas como adjuntos tecnológicos e não como aditivos alimentares, também não possuem demanda de função tecnológica no produto final (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; NIGAM, 2013). Na legislação brasileira vigente, as enzimas microbianas no processamento de alimentos devem:

“Art. 10. (...) ser obtidas por métodos e condições que garantam a fermentação controlada e que impeçam a introdução de micro-organismos capazes de originar substâncias tóxicas ou indesejáveis. Art. 11. (...) enzimas de origem microbiana para uso na produção de alimentos devem ser estáveis, seguras, não patogênicas e não toxigênicas (BRASIL, 2014)”.

Na indústria de alimentos, as enzimas microbianas são utilizadas principalmente na panificação, suco de frutas e fabricação de queijos, bem como na produção de vinho e fabricação de cerveja (NIGAM, 2013). Comercialmente, as enzimas usadas no processamento de alimentos são preparações enzimáticas, que contêm não apenas a enzima desejada, mas também metabólitos da linhagem de produção e ingredientes ou aditivos alimentares, a fim de facilitar o seu armazenamento, comercialização, padronização, diluição ou dissolução (BRASIL, 2014; NIGAM, 2013).

2.5 ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

As enzimas pectinolíticas, também denominadas pectinases, são produzidas por diversos insetos, nematoides, plantas e, principalmente, por fungos filamentosos (gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*), leveduras e bactérias (BOM; FERRARA; CORVO, 2008), e no Brasil, o micro-organismo regulamentado para a produção de enzimas pectinolíticas é o *A. niger* (BRASIL, 2014).

As pectinases são enzimas que atuam na solubilização, desesterificação e despolimerização da pectina nativa (ALKORTA et al., 1998; BIZ et al., 2014). De modo geral, as pectinases contribuem para a degradação da pectina presente nos tecidos vegetais, favorecem o amolecimento dos mesmos e estão associadas ao processo de amadurecimento de frutos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; KASHYAP et al., 2001).

As enzimas pectinolíticas têm aplicações em diferentes segmentos da indústria (Tabela 1), com destaque em alimentos e bebidas (Tabela 2) (SANTI; BERGER; SILVA, 2014; UENOJO; PASTORE, 2007). São empregadas na extração e clarificação de sucos, promovem a melhoria das propriedades sensoriais do vinho, aumentam a eficiência de extração de óleos vegetais e aceleram do processo de fermentação do café e do chá (ALKORTA et al., 1998; BIZ et al., 2014; UENOJO; PASTORE, 2007). Além disso, as enzimas pectinolíticas são utilizadas como coadjuvantes tecnológicos em alimentos, principalmente para aves e ruminantes, para melhorar a digestibilidade e valor nutricional (BIZ et al., 2014).

Alguns fatores como os componentes do meio de cultura, condições de cultivo (pH, temperatura, aeração, agitação e tempo de incubação) são determinantes para a produção de enzimas pectinolíticas (BIZ et al., 2014; UENOJO; PASTORE, 2007). Além disso, há influência das técnicas utilizadas, sendo a fermentação em estado sólido (FES) a mais empregada, uma vez que propicia a produção de enzimas brutas mais concentradas, reduzindo dessa forma os custos de extração e purificação (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003; ZHENG; SHETTY, 2000).

Tabela 1 – Aplicações das enzimas pectinolíticas em diferentes áreas da indústria.

Indústria	Aplicação
Sucos e vinhos	Melhoria na extração de sucos, clarificação, pigmentos, liberação de aroma e outros compostos.
Alimentos	Produção de purês, polpas de frutas, liberação de aroma, compostos prebióticos e ração animal.
Óleos	Melhoria na extração de óleos e recuperação de óleos essenciais de cítricos, extração de agentes antioxidantes.
Bioetanol	Degradação da matéria orgânica e liberação de açúcares para degradação microbiana e produção de bioetanol.
Chá e café	Melhora na fermentação.
Têxtil	Tratamento das fibras naturais.
Papel	Branqueamento da polpa <i>kraft</i> .

Fonte: Adaptado de Santi, Berger e Silva (2014).

Em comparação à fermentação submersa (FS), as principais vantagens do uso da FES para produção de pectinases são: uso de biomassa e de resíduos agroindustriais; uso de reatores menores; maiores rendimentos, além da ausência de formação de espuma; menor demanda de energia e; facilidade de controle de contaminação devido à baixa quantidade de água no sistema (DAMASO; COURI, 2019).

Os resíduos agroindustriais, como cascas de frutas e bagaço, são utilizados como substrato para a produção de pectinases (KAUR; KUMAR; SATYANARAYAMA, 2004). São fontes para desenvolvimento microbiano, além disso, viabilizam a obtenção de enzimas com custo reduzido, sendo uma alternativa econômica e ecologicamente interessante (BIZ et al., 2014; DAMASO; COURI, 2019). A produção de sucos, vinhos e outros alimentos à base de vegetais, por exemplo, geram elevados volumes de resíduos agroindustriais. Estes podem ser utilizados como substratos para a produção de pectinases, minimizando os custos da produção dessas enzimas e sendo, indiretamente, um processo retroalimentado (SANTI; BERGER; SILVA, 2014).

As enzimas pectinolíticas são classificadas em dois grandes grupos, desmetoxilantes e despolimerizantes. O primeiro desesterifica a pectina transformando-a em ácido péctico por meio da remoção dos resíduos metoxila, já as enzimas despolimerizantes catalisam a quebra das ligações α -1,4 da cadeia principal da pectina (KASHYAP et al., 2001; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005), sendo as principais:

- **Poligalacturonases (PG)**
 - a. Endo-PG (EC 3.2.1.15): hidrolisa aleatoriamente as ligações α -1,4 entre unidades de ácido poligalacturônico.
 - b. Exo-PG 1 (EC 3.2.1.67): hidrolisa as ligações sucessivas do ácido poligalacturônico, a partir da extremidade não-redutora, liberando ácidos galacturônicos.
 - c. Exo-PG 2 (EC 3.2.1.82): hidrolisa as ligações alternadas do ácido poligalacturônico, a partir do terminal não-redutor, liberando ácidos digalacturônicos.

- **Polimetilgalacturonases (PMG)**
 - a. Endo-PMG (EC 3.2.1.15): hidrolisa a ligação glicosídica α -1,4 da pectina, preferencialmente, na pectina altamente esterificada.
 - b. Exo-PMG (EC 3.2.1.15): hidrolisa a ligação glicosídica α -1,4 da pectina na extremidade não redutora da cadeia da pectina.

- **Poligalacturonato Liase (PGL)**
 - a. Endo-PGL ou endo-pectato liase (EC 4.2.2.2): hidrolisa as ligações glicosídicas internas entre resíduos de ácido pectico por trans-eliminação.
 - b. Exo-PGL ou exo-pectato liase (EC 4.2.2.9): hidrolisa as ligações glicosídicas entre resíduos de ácido galacturônico por trans-eliminação, a partir de terminais não-redutores

- **Polimetilgalacturonato liase (PMGL)**
 - a. Endo-PMGL ou endo-pectina liase (EC 4.2.2.10): hidrolisa as ligações glicosídicas entre resíduos de ácidos galacturônicos por um mecanismo de trans-eliminação.
 - b. Exo-PMGL ou exo pectina liase: hidrolisa a pectina, sequencialmente, por trans-eliminação.

Segundo Zheng e Shetty (2000), as poligalacturonases são comumente aplicadas em processos envolvendo frutas e vegetais. Essa classe de pectinases podem ser divididas em endoenzimas, que agem dentro da molécula em acoplamentos de α -1,4 e, em exoenzimas, que catalisam a hidrólise de galacturônicos, moléculas ácidas de não redução no término da cadeia (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Tabela 2 – Funções e aplicações das pectinases na indústria de alimentos e bebidas.

Enzima	Função	Aplicação
Poligalacturonase com alta atividade de pró-pectinase e baixa celulase	Hidrólise parcial de pró-pectina	Produção de purês com alta viscosidade
Poligalacturonase e pectina trans-eliminase com baixa atividade de pectina esterase e hemicelulase	Hidrólise parcial de pró-pectina e de pectina solúvel em fragmentos de tamanho médio, formação de precipitado e remoção de hidrocolóides de celulose	Produção de sucos vegetais não clarificados de baixa viscosidade
Poligalacturonase e pectina trans-eliminase	Hidrólise completa de pectina e de eliminase e hemicelulase. polissacarídeos ramificados	Clarificação de sucos de frutas
Pectinase	Hidrólise de polissacarídeos das paredes celulares vegetais; infusão de pectinase para facilitar o descascamento e melhorar a firmeza de frutas e vegetais	Maceração da casca e extração de pigmentos de frutas, estabilidade, filtração e clarificação de bebidas; alteração das propriedades sensoriais de frutas e vegetais
Pectina esterase com atividade de poligalacturonase e pectina liase	Processamento de frutas	Produção de molhos e polpas de frutas
Pectina esterase	Desesterificação e gelificação de pectina	Clarificação de sidra

Fonte: Adaptado de Uenojo e Pastore (2007).

2.5.1 Métodos para determinação de atividade da pectinase

Para determinar a atividade catalítica de uma enzima, é necessário, primeiramente, identificar as alterações químicas que envolvem a conversão de substrato a produto. As enzimas apresentam atividades de acordo com os tipos de reações químicas que catalisam (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; HARRIS; KESHWANI, 2009). Além disso, para determinar a atividade enzimática, as propriedades físico-

químicas de um determinado substrato devem ser conhecidas, em relação às do produto de forma quantificável (HARRIS; KESHWANI, 2009).

Os métodos existentes permitem a determinação da atividade da pectinase total ou atividades individuais das poligalacturonases, pectinases e pectinases metilesterases (JAKÓB; BRYJAK; POLAKOVIC, 2009). Dentre os mais utilizados, cabe destacar os métodos espectrofotométricos e viscosimétricos (JAKÓB; BRYJAK; POLAKOVIC, 2009). Os métodos espectrofotométricos são simples e precisos, no qual a absorbância de luz na faixa do ultravioleta e do visível é avaliada (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). Há uma relação direta entre a atividade enzimática e a concentração do analito, além disso, a sensibilidade do método e o limite de detecção são relacionados com a absorvidade molar (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; JAKÓB; BRYJAK; POLAKOVIC, 2009).

A determinação da atividade da pectinase via métodos espectrométricos inclui a hidrólise da pectina contendo o extrato enzimático, incubado por determinado período de tempo, sob pH, temperatura e concentração inicial de pectina conhecidos (BIZ et al., 2014; JAKÓB; BRYJAK; POLAKOVIC, 2009). Conforme o método de quantificação de açúcares redutores liberados, são obtidas as curvas padrão, por ADNS (MILLER, 1959) ou pelo método de Somogyi (1952). Ambos são simples, de fácil adaptação e reprodutibilidade em laboratório, além disso, podem ser utilizados para analisar elevado número de amostras (BIZ et al., 2014).

Os padrões de ação das enzimas pectinolíticas também podem ser determinados por análises viscosimétricas (COLLMER; RIED; MOUNT, 1988). Segundo Coelho, Salgado e Ribeiro (2008), pectinases têm sua atividade determinada pela redução da viscosidade de uma solução de pectina sob condições reacionais padronizadas. Durante a produção de pectinases de uso na indústria de alimentos, a atividade pectinolítica é determinada dessa forma (BIZ et al., 2014).

Mutlu et al. (1999), desenvolveram método para a determinação da atividade pectinolítica total utilizando medidas de viscosidade em diferentes concentrações iniciais de pectina e temperaturas controladas. No entanto, esse método é válido somente para soluções de pectina pura (JAKÓB; BRYJAK; POLAKOVIC, 2009). Devido à prevalência de inibidores de pectinase, os resultados dos extratos de tecidos vegetais devem ser interpretados com cautela (COLLMER; RIED; MOUNT, 1988).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

As maçãs deterioradas das variedades Fuji e Gala, com características de contaminação fúngica (podridão olho-de-boi e mofo azul) que seriam descartadas, foram fornecidas por cooperativas da região serrana produtoras de maçãs do estado de Santa Catarina e pelos boxes da Central de Abastecimento do Estado de Santa Catarina S/A (CEASA – SC). As maçãs próprias para consumo dessas mesmas variedades, tiveram igual procedência.

Os reagentes utilizados foram de grau analítico ou cromatográfico, conforme o requerimento das análises.

A enzima comercial de referência foi a Pectinex Ultra SP-L (≥ 3.800 U/mL), produzida pela Novozyme.

O substrato empregado foi a pectina cítrica comercial (Vetec®).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Coleta e transporte das maçãs deterioradas

Foram coletadas maçãs Fuji e Gala deterioradas, que seriam descartadas, de modo aleatório em visita às cooperativas em São Joaquim (SC) e ao CEASA em dias diferentes, somando cerca de 10 Kg de amostras. As maçãs controle (próprias para consumo) foram adquiridas nos boxes de compra do CEASA. Todas as maçãs foram classificadas quanto à variedade, armazenadas em recipientes isotérmicos com gelo e transportadas até o laboratório de Tecnologia de Frutas e Hortaliças, CCA, UFSC. As maçãs foram selecionadas de modo aleatório, considerando o menor grau de maturação/deterioração (Figura 7), posteriormente foram classificadas e acondicionadas em sacos de polietileno (devidamente lacrados), e permaneceram sob refrigeração até o momento do preparo das polpas (Figura 8).

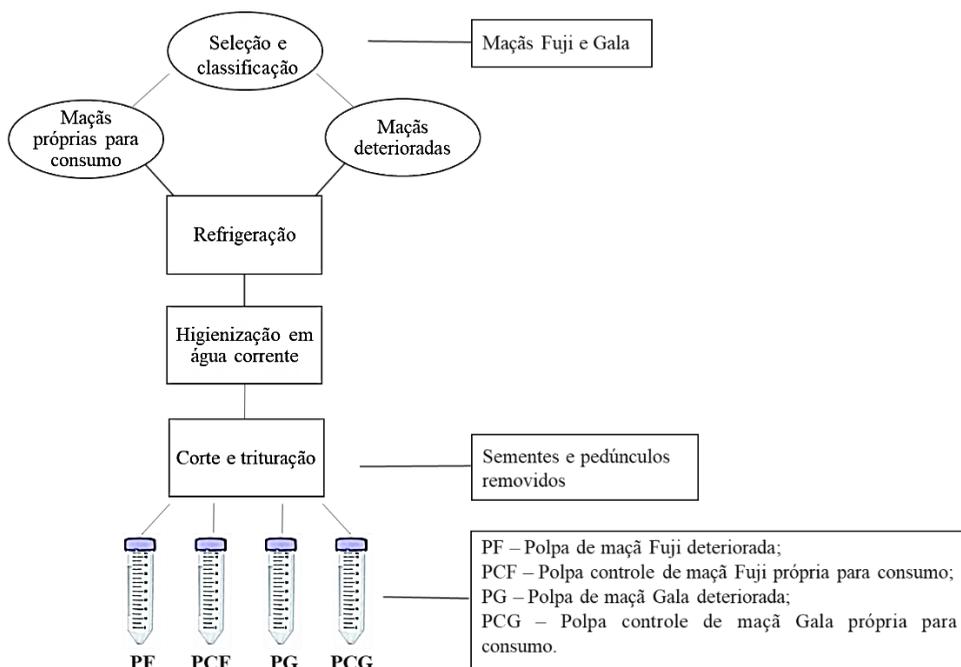
Figura 7 – Padrão das maçãs deterioradas e próprias para consumo (controle) das variedades Fuji e Gala selecionadas para o preparo das polpas.



Fonte: Autora (2019).

Conforme demonstrado na Figura 8, as maçãs foram lavadas em água corrente, cortadas manualmente, sementes e pedúnculos foram removidos, e posteriormente trituradas em liquidificador com as cascas. As polpas obtidas foram acondicionadas em tubos Falcon de 50 mL, devidamente identificados, e mantidos sob refrigeração até a realização das análises de caracterização físico-química e preparo dos extratos enzimáticos.

Figura 8 – Fluxograma de preparo das polpas de maçãs deterioradas e próprias para consumo, dos tipos Fuji e Gala.



Fonte: Autora (2019).

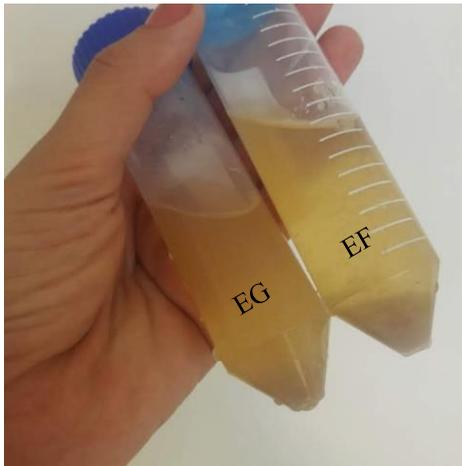
3.2.2 Caracterização das polpas de maçã

As polpas de maçã foram caracterizadas quanto aos teores de sólidos totais, lipídeos (extração por Soxhlet), proteínas totais por micro Kjeldahl ($N \times 6,25$) e resíduo mineral fixo (AOAC, 2005). Os teores de fibra alimentar foram determinados pelo método enzimático-gravimétrico a partir da combinação de enzimas (α -amilase, protease e amiloglucosidase), fornecidas pela Megazyme International Ireland, método 958.29 (AOAC, 2005). As polpas de maçã também foram caracterizadas quanto ao teor de sólidos solúveis totais ($^{\circ}$ Brix), pH em pHmetro (Quimis Q400MT) e acidez titulável (IAL, 2008).

3.2.3 Obtenção e caracterização dos extratos enzimáticos

Os extratos enzimáticos brutos (Figura 9) foram preparados a partir das polpas de maçãs deterioradas e próprias para consumo (controle) dos tipos Fuji e Gala, conforme o pedido de patente n. 226529 submetido na Secretaria de Inovação da Universidade Federal de Santa Catarina (CAVALCANTE; AMANTE, 2018).

Figura 9 – Extratos enzimáticos brutos preparados a partir das polpas de maçãs dos tipos Fuji (EF) e Gala (EG) deterioradas.



Fonte: Autora (2019).

Os extratos foram caracterizados quanto ao pH, acidez titulável, proteínas solúveis totais (BRADFORD, 1976), sólidos solúveis totais (°Brix), atividade enzimática conforme Miller (1959) e Jakób, Bryjak e Polakovic (2009), e micotoxina patulina (HARTWIG; KUPSKI; BADIALE-FURLONG, 2019).

3.2.3.1 Determinação da acidez titulável

Os extratos enzimáticos foram avaliados quanto a acidez titulável, sendo os resultados expressos em mL de NaOH por 100 mL de amostra (IAL, 2008). Esse método baseia-se na titulação com NaOH 0,1 M até o

ponto de viragem com o indicador fenolftaleína, e é calculado conforme a Equação 1.

$$\text{Acidez (mL / 100 mL)} = \frac{V \cdot f \cdot M \cdot 100}{P} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: V = n°. de mL da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação; f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio; P = massa da amostra em g ou volume pipetado em mL; M = molaridade da solução de hidróxido de sódio.

3.2.3.2 Determinação do teor de proteínas solúveis

O teor de proteínas solúveis foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi, U-1800, Japan) (595 nm) e BSA (albumina do soro bovino) como padrão. Obteve-se a curva $y = 0,0071 x + 0,0155$ e $R^2 = 0,9949$.

3.2.3.3 Sólidos solúveis totais (°Brix)

A fim de relacionar o percentual de proteínas solúveis nos sólidos totais, foi determinado o teor de sólidos solúveis totais (°Brix) por refratometria (IAL, 2008).

3.2.3.4 Determinação de micotoxina patulina

A micotoxina patulina (PAT) nos extratos enzimáticos obtidos das maçãs Fuji e Gala deterioradas, foi determinada em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (DAD), coluna analítica Gemini C18 (250 cm x 4,6 mm 5µm), fase móvel de H₂O:ACN na proporção 90:10 v / v, vazão de 0,8 mL / min e comprimento de onda de 276 nm, segundo Hartwig, Kupski e Badiale-Furlong (2019) com modificações.

O Limite de Detecção (LOD) e o Limite de Quantificação (LOQ) instrumentais foram determinados em função do sinal ruído da linha de base, considerando a concentração que apresentou no mínimo sinal de três vezes superior ao ruído para o LOD e 10 vezes para o LOQ. A curva analítica foi construída com solução trabalho de PAT na concentração de

6,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, utilizando soluções com concentrações crescentes entre 10 – 1000 ng.mL^{-1} , diluídos em 1 mL de fase móvel, e obteve-se curva padrão $y = 50,408x + 142,94$; $R^2 = 0,998$; e limites LOD = 3,3 ng.mL^{-1} ; LOQ = 10 ng.mL^{-1} .

3.2.3.5 Determinação de atividade da pectinase

Foram preparadas soluções com 30 mL de pectina a 1 % (m/v) (método espectrofotométrico) e 5 % (m/v) (método viscosimétrico), contendo 0,1 mL dos extratos enzimáticos brutos obtidos de maçãs deterioradas e próprias para consumo (controle), dos tipos Fuji e Gala, e 0,1 mL da enzima comercial Pectinex Ultra SP-L, separadamente e em triplicata. Seguido da hidrólise em banho-maria a 45, 50 e 60 °C, por 30 e 60 minutos para cada temperatura, e determinada a atividade da pectinase conforme descrito nos itens “a” e “b”, a seguir. Soluções de pectina pura foram empregadas como controle negativo.

a. Método espectrofotométrico

Após realizada a hidrólise a 45, 50 e 60 °C das soluções com 30 mL de pectina 1 % e 0,1 mL dos extratos enzimáticos e da enzima comercial, separadamente, e o branco, por 30 e 60 minutos, foi determinada a atividade da pectinase pelo método do ácido dinitrossalicílico (ADNS), conforme metodologia descrita por Miller (1959) com modificações (substituindo a glicose por ácido galacturônico).

Em tubos de ensaio devidamente identificados, foram adicionados 0,2 mL das preparações hidrolisadas, 1,8 mL de água destilada e 1 mL de ADNS. Os tubos foram aquecidos em banho-maria (100 °C por 5 minutos), em seguida, resfriados em banho de gelo. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi, U-1800, Japan) (550 nm). A absorbância do controle negativo foi subtraída das demais leituras. Considerando que a hidrólise da pectina gera ácido galacturônico, a curva padrão foi construída com ácido galacturônico (Sigma-Aldrich) ($y = 0,0011x - 0,0168$; $R^2 = 0,9968$).

A atividade da pectinase foi expressa conforme Jakób, Bryjak e Polakovic (2009) com modificações, no qual uma unidade de pectinase é definida como a atividade enzimática que libera 1 μmol de ácido galacturônico por minuto sob as condições do ensaio. Posteriormente foi

determinada a atividade específica de poligalacturonase, sendo considerado o teor de proteínas solúveis.

b. Redução da viscosidade

Após 30 minutos de hidrólise a 45, 50 e 60 °C das soluções com 30 mL de pectina a 5 % e 0,1 mL dos extratos enzimáticos e da enzima comercial, separadamente, foi determinada a atividade da pectinase através da redução da viscosidade, conforme metodologia proposta por Jakób, Bryjak e Polakovic (2009), com modificações. Soluções de pectina pura foram empregadas como controle negativo.

A análise foi conduzida em reômetro, modelo Brookfield RVDV-IIIICP e *spindle* do tipo ULA. As medições de fluxo em estado estacionário foram realizadas para as amostras em cada temperatura durante 20 minutos e os parâmetros reológicos (tensão de cisalhamento, taxa de deformação, viscosidade aparente) foram obtidos a partir do Software Rheocalc 32. As curvas de fluxo experimentais foram ajustadas para o modelo de Lei da Potência, dado pela Equação 2 (ROSA, 2016).

$$T = k (\dot{\gamma})^n \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: T = tensão de cisalhamento (μPa); k = índice de consistência ($\mu\text{Pa}\cdot\text{s}^n$); $\dot{\gamma}$ = taxa de deformação; n = índice de comportamento do fluxo (adimensional).

Após a determinação da viscosidade da solução de pectina a 5 % e das viscosidades após o tempo de hidrólise, a atividade da pectinase foi determinada. Uma unidade de atividade da pectinase corresponde à redução da viscosidade da pectina até a metade da viscosidade inicial, por minuto, por mL de extrato, de acordo com Jakób, Bryjak e Polakovic (2009), com modificações.

3.2.4 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata, no mínimo, e para a análise estatística dos resultados foi utilizado o software STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA). Foi realizada a análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey para determinar as diferenças significativas ($p < 0,05$) e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS POLPAS DE MAÇÃ

A maçã é constituída majoritariamente por água, mas os constituintes de maior valor nutricional são os carboidratos (CÓRDOVA, 2006). A composição (Tabela 3) das polpas de maçãs próprias para consumo e das maçãs deterioradas empregadas para a produção do extrato enzimático, indica que todas as amostras apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$) em relação ao teor de sólidos totais, sendo que as polpas controles (próprias para consumo) de maçã Fuji e Gala (PCF e PCG) apresentaram os maiores valores. Contudo, estatisticamente não houve diferença significativa entre as amostras em relação ao resíduo mineral fixo (RMF) e proteína total.

Tabela 3 – Composição físico-química das polpas de maçãs deterioradas e próprias para consumo (controle), dos tipos Fuji e Gala.

Amostra	Sólidos totais (g/100g)	RMF (g/100g)	Lipídeos (g/100g)	Proteína (g/100g)	Fibra Alimentar total (g/100g)
PF	10,54 ± 0,07 ^d	1,23 ± 0,04 ^a	4,04 ± 0,03 ^a	0,027 ± 0,0003 ^a	1,10 ± 0,14 ^b
PCF	16,50 ± 0,39 ^a	0,96 ± 0,12 ^a	3,56 ± 0,13 ^{ab}	0,019 ± 0,0004 ^a	1,60 ± 0,28 ^{ab}
PG	13,11 ± 0,25 ^c	1,39 ± 0,24 ^a	1,89 ± 0,02 ^b	0,020 ± 0,0001 ^a	2,30 ± 0,42 ^a
PCG	15,11 ± 0,29 ^b	2,70 ± 0,18 ^a	1,46 ± 0,03 ^b	0,021 ± 0,0003 ^a	2,15 ± 0,07 ^{ab}

PF – polpa de maçã Fuji deteriorada; PG – polpa de maçã Gala deteriorada; PCF – polpa controle de maçã Fuji própria para consumo; PCG – polpa controle de maçã Gala própria para consumo. Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).

De acordo com Córdova (2006) e Granero et al. (2012), os teores de proteínas em maçãs são baixos, sendo a maior parte enzimas relacionadas ao metabolismo da fruta. Nesse sentido, os resultados observados estão coerentes, uma vez que as polpas de maçã apresentaram baixo teor de proteína (Tabela 3).

Em relação às fibras (Tabela 3), as amostras apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), e os valores variaram de 1,10 a 2,30 g / 100 g. Estes resultados podem estar relacionados com os compostos da estrutura do tecido vegetal, predominantemente celulose, hemicelulose e pectina, de alta massa molecular (ALBUQUERQUE et al., 2006), uma vez que as polpas foram elaboradas com as cascas dos frutos. Quanto ao teor de lipídeos, a polpa de maçã Fuji (PF) diferenciou-se das demais amostras ($p < 0,05$), apresentando maior valor (Tabela 3). Os lipídeos estão associados às camadas protetoras das células e da epiderme dos frutos (CÓRDOVA, 2006). Considerando a presença das cascas nas polpas, os resultados observados podem estar relacionados aos compostos lipídicos (ceras) presentes nas cascas.

De acordo com Girardi et al. (2015), o processo de amadurecimento das maçãs inclui alterações físicas e bioquímicas, como degradação da parede celular, degradação de clorofilas e síntese de pigmentos, acúmulo de açúcares como sacarose, glicose e frutose, redução de ácidos orgânicos e produção de compostos voláteis. Após o armazenamento dos frutos, mesmo em temperaturas de refrigeração, ocorrem alterações físicas e estruturais decorrentes, principalmente, do amolecimento dos tecidos (CHITARRA; CHITARRA, 2005; GIRARDI et al., 2015). De modo geral, a composição das polpas (Tabela 3) variou com o tipo de cultivar, mas não em relação ao estado de conservação dos frutos. Segundo Silva (2004), a composição físico-química das frutas descartadas nas etapas de seleção e classificação e que apresentam deformidades, machucaduras ou manchas, é similar às maçãs comercializadas.

O teor de sólidos solúveis totais (SST) presente na polpa dos frutos incluem compostos relacionados ao grau de maturação, sendo considerada uma medida indireta da composição de açúcares e ácidos orgânicos (LIMA, 2018). Segundo Chitarra e Chitarra (2005), o SST em maçãs varia conforme as espécies, cultivares, estágios de maturação e clima, podendo ocorrer na faixa de 2 a 25 %. O °Brix das polpas (Tabela 4) variou de 4,75 a 6,05. Contudo, PCF apresentou menor SST que os teores relatados por Brackmann, Hunsche e Steffens (2000) e Vieira et al. (2009) para maçã Fuji.

Tabela 4 – pH, acidez titulável e teor de sólidos solúveis totais (SST) das polpas de maçãs deterioradas e próprias para consumo (controle), dos tipos Fuji e Gala.

Amostra	pH	Acidez titulável (mL/100 mL)	SST (°Brix)
PF	3,79 ± 0,02 ^d	10,16 ± 0,07 ^a	4,75 ± 0,00 ^c
PCF	4,67 ± 0,03 ^a	2,16 ± 0,07 ^c	6,00 ± 0,00 ^a
PG	4,20 ± 0,01 ^c	3,74 ± 0,05 ^b	5,50 ± 0,00 ^b
PCG	4,33 ± 0,01 ^b	3,82 ± 0,12 ^b	6,05 ± 0,07 ^a

PF – polpa de maçã Fuji deteriorada; PG – polpa de maçã Gala deteriorada; PCF – polpa controle de maçã Fuji própria para consumo; PCG – polpa controle de maçã Gala própria para consumo. Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).

Dentre os sólidos solúveis presentes em maçãs, destacam-se os açúcares simples, principalmente a frutose (FANTE, 2011). As maçãs deterioradas tendem a apresentar menores teores de SST, em função da utilização desses compostos como fonte de carbono no processo microbiológico envolvido na degradação (STINSON et al., 1981). A acidez e o pH da polpa de maçã Fuji deteriorada (PF), estão de acordo com essa consideração, tendo apresentado maior acidez (Tabela 4). Embora PG e PCG tenham apresentado diferenças significativas entre si ($p < 0,05$) quanto aos teores SST, essas polpas não diferiram quanto à acidez. Resultados que refletem a importância dos estudos com diferentes tipos de maçãs e seu estado de conservação.

Todas as amostras apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) quanto ao pH e a acidez das polpas (Tabela 4), salvo a acidez de PG e PCG, que não apresentaram diferença significativa entre si. As polpas controles apresentaram maiores pHs. Vieira et al. (2009) obtiveram resultados que variaram entre 3,90 e 4,27 para o pH de diferentes cultivares de maçã, sendo que para Fuji foi 3,99, valor próximo ao pH de PF. Contudo, cabe ressaltar que fatores como solo, clima, condições de cultivo, bem como tipos de cultivares, tratamentos fitossanitários e outros, influenciam na composição físico-química da maçã (FANTE, 2011; VIEIRA et al., 2009).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTOS

A atividade catalítica das enzimas é influenciada por fatores como concentração do biocatalizador e do substrato, pH e temperatura (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). As pectinases de origem fúngica atuam em pH próximo ao de muitos sucos de frutas, de 3,00 a 5,50, e, por isso, sua forte aplicação nesse setor (UENOJO; PASTORE, 2007). Todas as amostras apresentaram pH próximo à essa faixa (Tabela 5), indicando possível influência dos extratos sobre a estabilidade da pectina e presença de pectinases (BRAGANTE, 2009). De acordo com Tapre e Jain (2014), as endo-pectinases, exo-pectinases e endo-PG produzidas por *A. niger* e *P. frequentans*, têm pH ótimo de atuação entre 3,5 e 6, sendo estas as possíveis enzimas pectinolíticas presentes nos extratos enzimáticos obtidos de maçãs Fuji e Gala deterioradas (EF e EG, respectivamente).

Os extratos apresentaram resultados de acidez menores do que as polpas de maçã (Tabelas 4 e 5), e com diferenças significativas entre si ($p < 0,05$), sendo EF e EG com maior acidez (Tabela 5). Considerando que os extratos foram preparados com as polpas de maçãs deterioradas, o consumo de carboidratos nos processos microbiológicos relacionados à decomposição dos frutos e a ação de pectinases, podem ter contribuído para a redução da acidez nos extratos (FANTE, 2011; VIEIRA et al., 2009; SANTI; BERGER; SILVA, 2014). Além disso, a diminuição da acidez era esperada, uma vez que há maior concentração de íons de hidrogênio no meio (ATKINS; JONES, 2006) devido aos extratos brutos serem aquosos (CAVALCANTE; AMANTE, 2018).

Tabela 5 – pH, acidez titulável, teor de proteínas solúveis (PS) e sólidos solúveis totais (SST) dos extratos brutos obtidos das polpas de maçãs deterioradas e próprias para consumo (controle), dos tipos Fuji e Gala.

Amostra	pH	Acidez titulável (mL/100 mL)	PS (g/100 mL)	SST (°Brix)
EF	4,07 ± 0,03 ^c	1,12 ± 0,03 ^a	0,0391 ± 0,003 ^b	4,00 ± 0,00 ^c
ECF	4,27 ± 0,05 ^a	0,92 ± 0,03 ^c	0,0465 ± 0,003 ^b	5,00 ± 0,00 ^a
EG	4,00 ± 0,04 ^{cd}	1,20 ± 0,03 ^a	0,0662 ± 0,002 ^a	5,00 ± 0,00 ^a
ECG	4,15 ± 0,01 ^b	1,05 ± 0,02 ^b	0,0660 ± 0,002 ^a	4,23 ± 0,03 ^b

EF – Extrato enzimático bruto obtido de maçã Fuji deteriorada; ECF – Extrato enzimático controle bruto obtido de maçã Fuji própria para consumo; EG – Extrato enzimático bruto obtido de maçã Gala deteriorada; ECG – Extrato enzimático controle bruto obtido de maçã Gala própria para consumo. Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna demonstram diferença significativa ($p < 0,05$).

De acordo com Tapre e Jain (2014), as enzimas pectinolíticas são utilizadas na produção de conservas e causam aumentos consideráveis de SST, além disso, são empregadas nas polpas e sucos de frutas por aumentarem o rendimento durante a extração. Em comparação às polpas de maçã, todos os extratos apresentaram menores teores de SST (Tabelas 4 e 5). Considerando as reduções dos teores de SST, há indícios de que os compostos gerados pela ação das pectinases sobre a pectina das maçãs já não sejam detectados como sólidos solúveis totais pelo método empregado nessa análise (refratometria).

Em relação ao teor de proteínas solúveis (PS), os extratos apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$) em relação à variedade de maçã, mas não entre seus respectivos controles (Tabela 5). Contudo, o extrato enzimático obtido de maçã Gala deteriorada (EG) apresentou maior teor de PS. De modo geral, todas as amostras apresentaram baixos teores de PS e esse resultado era esperado, uma vez que os teores de proteínas em maçãs são naturalmente baixos, corroborando com o que também foi demonstrado nos resultados de proteína total das polpas (Tabela 4) (GRANERO et al., 2012).

Dhillon, Kaur e Brar (2013) afirmaram que o crescimento de leveduras no bagaço de maçã aumenta os teores de proteína. Já Joshi, Parmar e Rana (2011) relatam redução do teor de PS (de 6,20 para 2,10

g/100 mL) ao purificarem pectinases obtidas de bagaço de maçã e, ainda assim, superior ao teor de EG. Nesse sentido, sugere-se investigar processos de purificação e a segurança para a utilização dos extratos (EF e EG) como substratos em processos fermentativos visando aumentar o teor de PS.

4.3 DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINA PATULINA NOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTOS

As maçãs deterioradas utilizadas para o preparo dos extratos eram visivelmente acometidas pelo mofo azul, provavelmente os fungos presentes nessas maçãs produziram a micotoxina patulina (PAT). Considerando a proporção de maçãs utilizadas nos extratos (CAVALCANTE; AMANTE, 2018), a presença de PAT foi baixa. Somente os extratos obtidos de maçãs Fuji e Gala deterioradas (EF e EG, respectivamente) apresentaram PAT (EF = $4,57 \pm 0,12 \mu\text{g.L}^{-1}$; EG = $1,52 \pm 0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$), os controles apresentaram teores de PAT abaixo dos Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ).

Os extratos estão de acordo com os Limites Máximos Tolerados (LMT) de PAT em produtos de maçã ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$) (BRASIL, 2011), porém, acima do limite estabelecido pelo JECFA, que determina como Limite de Ingestão Diária Tolerável Máxima Provisória (PMTDI) de patulina, $0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de peso corpóreo / dia (FDA, 2001). Devido à toxicidade da PAT, a Comissão do *Codex Alimentarius* estabeleceu como concentração máxima aceitável $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de patulina em suco de maçã (CODEX, 2003). Além disso, de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1881 (2006), na União Europeia, o nível máximo permitido para produtos de maçã destinados a crianças é $10 \mu\text{g.Kg}^{-1}$. Contudo, tais limites são definidos para produtos com fins de consumo alimentar, o que não é o caso dos extratos desenvolvidos neste estudo.

De acordo com Pinho (2014), a maçã proporciona melhores condições para manifestação do potencial toxigênico do *P. expansum*, sendo um ótimo substrato para o desenvolvimento da micotoxina. Além disso, estudos constataram alta ocorrência de *P. expansum* aliada à

presença de patulina em maçãs naturalmente deterioradas, sob armazenagem sem refrigeração (CELLI et al., 2009).

Santos et al. (2018), ao compararem diferentes métodos para controlar a atmosfera e o armazenamento de maçãs *in natura* sob refrigeração, verificaram o acúmulo de PAT com o tempo. Desde a coleta (em câmaras frias) até o momento de preparo dos extratos, as maçãs utilizadas permaneceram sob refrigeração e assim permaneceram até serem analisados (máximo 24 horas), contudo não foi avaliada a PAT em diferentes dias de armazenamento sob refrigeração. Hammami et al. (2017) detectaram teores intermediários aos de EF e EG ($3,71 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) em maçãs, e valores superiores em produtos processados a base de maçã.

Em vista da presença de patulina nos extratos enzimáticos, fica evidente o emprego destes em outros segmentos do agronegócio e da biotecnologia, não diretamente em processos de produção de alimentos e bebidas como as enzimas tradicionalmente comercializadas. Além disso, é de fundamental importância a avaliação da segurança dos extratos para PAT, sendo necessária a aplicação de técnicas de purificação dos mesmos.

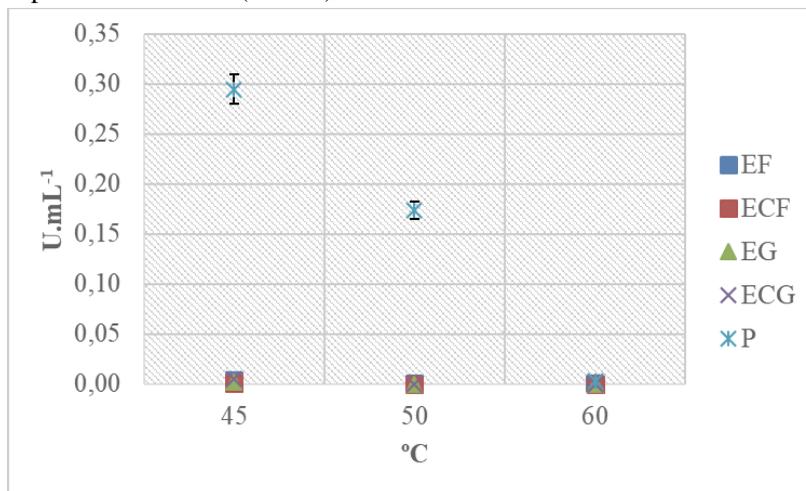
4.4 ATIVIDADE DA PECTINASE NOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTOS

O método mais utilizado para determinar a atividade da pectinase é o espectrofotométrico, após a hidrólise do extrato pectinolítico sob condições de pH, temperatura e concentração inicial de pectina conhecidos, seguido da liberação e quantificação dos açúcares redutores (BIZ et al, 2014). Com relação à temperatura, Jayani et al. (2005) identificaram que a faixa ótima de ação das pectinases varia de 30 a 50 °C. Por isso, inicialmente foi determinada a atividade da pectinase pelo método espectrofotométrico e avaliadas três temperaturas de hidrólise, inclusive, extrapolando a temperatura limite recomendada, a fim de avaliar o efeito da temperatura sob a hidrólise da pectina presente nos extratos em dois diferentes tempos.

Após realizada a hidrólise a 45, 50 e 60 °C das soluções de pectina a 1 % com 0,1 mL dos extratos enzimáticos e da enzima comercial, separadamente, por 30 minutos, pode-se observar que a melhor

temperatura de hidrólise foi de 45 °C para a enzima comercial (Figura 10). Contudo, os extratos apresentaram baixíssima atividade nessa temperatura, sendo EGC a maior (0,01 U.mL⁻¹). Nas demais temperaturas de hidrólise, nenhum dos extratos apresentaram atividade enzimática e a 60 °C, a enzima comercial também não apresentou atividade (Figura 10). Provavelmente pode ter ocorrido a desnaturação das pectinases com o aumento da temperatura de hidrólise, pois temperaturas elevadas, e no mais, superiores à temperatura ótima de ação da enzima, podem acarretar na desnaturação da mesma. Nessas condições, a ação catalítica das enzimas é reduzida em função do rompimento das pontes de hidrogênio, ligações bastante termolábeis, modificando assim a conformação estrutural, tornando-as menos ativa (BORZANI et al., 2001; COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

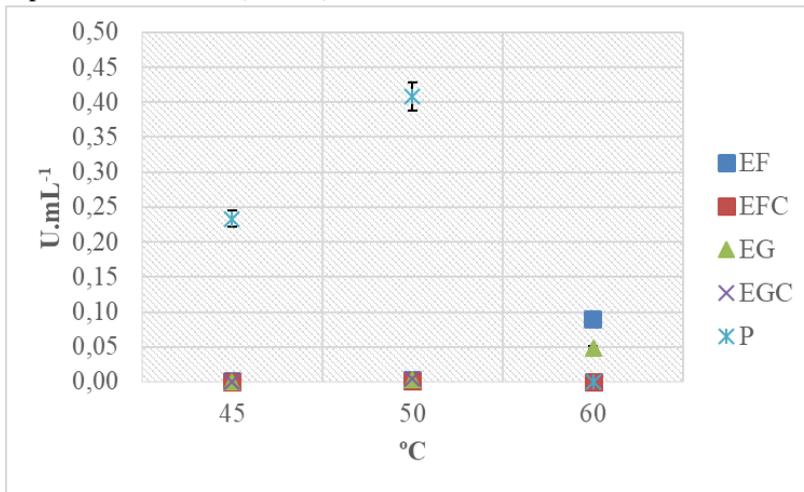
Figura 10 – Atividade específica da pectinase nos extratos brutos e da enzima de comercial após hidrólise por 30 minutos, através do método de espectrofotométrico (ADNS).



EF – Extrato enzimático bruto obtido de maçã Fuji deteriorada; ECF – Extrato enzimático controle bruto obtido de maçã Fuji própria para consumo; EG – Extrato enzimático bruto obtido de maçã Gala deteriorada; ECG – Extrato enzimático controle bruto obtido de maçã Gala própria para consumo; P – Pectinex Ultra SP-L. Resultados expressos como média ± desvio padrão.

Poletto et al. (2015), verificaram que a 40 °C a atividade da pectinase decaiu. Possivelmente há uma inativação parcial da enzima devido à combinação de temperatura e tempo de incubação. Mohsen, Bazaraa e Doukani (2009) e Hendges et al. (2011), relataram que as pectinases produzidas por diferentes cepas de *A. niger* mostraram-se relativamente estáveis em temperaturas de até 30 °C, mas suas atividades foram reduzidas para aproximadamente 60 e 80 % da inicial, respectivamente, após expostos a uma temperatura de 40 °C durante 60 minutos. Contudo, após hidrólise a 45 e 50 °C por 60 minutos, somente a enzima comercial (P) apresentou atividade, e a 60 °C os extratos obtidos de maçã deterioradas (EF e EG) apresentaram atividade enzimática, sendo EF com maior atividade (0,09 U.mL⁻¹) (Figura 11). Esse resultado era pouco esperado, uma vez que nessa temperatura, durante 30 minutos de hidrólise (Figura 10) não houve atividade enzimática em nenhum dos extratos, inclusive da enzima comercial, sendo que P permaneceu inativa a 60 °C (Figura 11).

Figura 11 – Atividade específica da pectinase nos extratos brutos e da enzima de comercial após hidrólise por 60 minutos, através do método de espectrofotométrico (ADNS).



EF – Extrato enzimático bruto obtido de maçã Fuji deteriorada; ECF – Extrato enzimático controle bruto obtido de maçã Fuji própria para consumo; EG – Extrato enzimático bruto obtido de maçã Gala deteriorada; EGC – Extrato enzimático controle bruto obtido de maçã Gala própria para consumo; P – Pectinex Ultra SP-L. Resultados expressos como média \pm desvio padrão.

Segundo Biz et al. (2014), os métodos existentes podem ter a interferência da presença de outras enzimas, produtos químicos, pigmentos ou inibidores pécticos. Além disso, o método espectrofotométrico utilizando ADNS parte do princípio da determinação de açúcares redutores (MILLER, 1959). Pode ser que a hidrólise da pectina tenha gerado açúcares, e o que foi observado seja um resultado falso-positivo, uma vez que não há evidências técnicas de que a 60 °C hidrólise por 60 minutos, ainda hajam enzimas pectinolíticas ativas nos extratos.

Visto que em 30 minutos de hidrólise os resultados obtidos foram menos divergentes e dentro do esperado, comparou-se a atividade da pectinase dos extratos e da enzima comercial pelo método viscosimétrico, utilizando gel de pectina 5 %. Os extratos apresentaram melhor atividade a 50 °C (Tabela 6), sendo EG o de maior atividade. Jakó**b**, Bryjak e Polakovic (2009) consideraram o método viscosimétrico simples, porém, não observaram mudança de viscosidade da solução de pectina, devido à baixa atividade enzimática nos seus extratos estudados.

Tabela 6 – Atividade específica da pectinase nos extratos brutos em relação à redução da viscosidade do gel de pectina a 5 % (m/v), após hidrólise por 30 minutos a 45, 50 e 60 °C.

Amostra	Atividade pectinase (U.mL ⁻¹)		
	45 °C	50 °C	60 °C
	EF	0,009 ± 0,60 ^{Ca}	0,009 ± 0,78 ^{Ca}
ECF	0,012 ± 0,50 ^{Ba}	0,011 ± 0,57 ^{Cb}	0,010 ± 0,31 ^{Bc}
EG	0,012 ± 0,51 ^{Bc}	0,017 ± 0,73 ^{Ba}	0,011 ± 0,19 ^{Bc}
ECG	0,012 ± 0,55 ^{Bc}	0,015 ± 1,62 ^{Ba}	0,014 ± 0,23 ^{Bb}
P	0,208 ± 1,59 ^{Ab}	0,277 ± 0,48 ^{Ab}	0,186 ± 1,09 ^{Ac}

EF – Extrato enzimático bruto obtido de maçã Fuji deteriorada; ECF – Extrato enzimático controle bruto obtido de maçã Fuji própria para consumo; EG – Extrato enzimático bruto obtido de maçã Gala deteriorada; ECG – Extrato enzimático controle bruto obtido de maçã Gala própria para consumo; P – Pectinex Ultra SP-L. Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras minúscula sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas entre a atividade da pectinase em diferentes temperaturas testadas para a hidrólise do mesmo extrato. Diferentes letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os extratos analisados na mesma temperatura de hidrólise (p < 0,05).

De acordo com Mohsen, Bazaraa e Doukani (2009), as poligalacturanases são relativamente termoinstáveis e a perda de atividade é proporcional ao aumento da temperatura, mas apenas P apresentou esse comportamento (Tabela 6). Segundo Coelho, Salgado e Ribeiro (2008), as pectinases podem ter sua atividade enzimática determinada pela redução da viscosidade do gel de pectina. Apesar dos

extratos apresentarem atividade menores que P, foi observada influência dos extratos na viscosidade do gel de pectina. Entretanto, devido à presença de inibidores de pectinase e outros interferentes, os resultados de redução da viscosidade da pectina utilizando frutos e vegetais devem ser interpretados com cautela (COLLMER; RIED; MOUNT, 1988).

5 CONCLUSÃO

As maçãs deterioradas descartadas da estocagem sob refrigeração, dos tipos Fuji e Gala, podem ser fontes para a produção de enzimas pectinolíticas, uma vez que a partir dessas maçãs foi possível elaborar extratos enzimáticos brutos. A atividade enzimática dos extratos foi determinada por duas metodologias distintas, através destas observou-se atividade da pectinase. Contudo, mais estudos são necessários a fim de aprimorar e melhorar o desempenho dos mesmos, avaliar sua aplicabilidade e uso.

5.1 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Pode-se estudar o mecanismo de produção de enzimas pectinolíticas pelos micro-organismos contaminantes de maçãs. Além disso, purificar e otimizar a obtenção dos extratos enzimáticos a partir de maçãs descartadas mantidas sob refrigeração, para produção em maior escala, e avaliar seu uso para fins agronômicos, como a obtenção de oligômeros com atividade elicitora e, através de ensaios *in vitro*, verificar o efeito dessas moléculas em doenças de plantas.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists**. 18th edition. Maryland, USA, 2005.

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2016. 480p.

ALBUQUERQUE, P.M. **Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã**. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

ALBUQUERQUE, P. et al. Production of *Rhizopus oligosporus* protein by solid state fermentation of apple pomace. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 5, p. 91-100, 2006.

ALKORTA, I. et al. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 21-28, 1998.

AMIRI, A.; BOMPEIX, G. Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre-and postharvest environments: consequences for decay development. **Plant Pathology**, London, v. 54, n. 1, p. 74-81, 2005.

AMPARO, H. C. et al. Determination of patulin in apple juice from fuji apples stored in different conditions in southern Brazil. **Journal of Food Research**, v. 1, n. 3, 2012.

ANDRADE, S. et al. **Influência do modo de produção, biológico versus convencional, nas propriedades nutricionais, sensoriais e de textura de maçãs regionais**. Alcobaça: Actas Portuguesas de Horticultura, 2009. 7 p.

ARAÚJO, L. et al. Doenças da macieira e da pereira. **Informe agropecuário**, v. 37, p. 61-74, 2016.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente**. 3. ed. Porto Alegre, RS: Bookman, 2006.

BAERT, K. et al. Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n.3, p. 170-181, 2007.

BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL – BRDE (Org.). **Cadeia Produtiva da Maçã no Brasil**: limitações e potencialidades. Porto Alegre: BRDE, 2011. 45 p.

BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL - BRDE (Org.). **MAÇÃ - Cadeia Produtiva**. Brasília: Comissão de Agricultura, Pecuária, Abastecimento e Desenvolvimento Rural, 2015. 12 p.

BERTHILLER, F. et al. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, p. 33-37, 2007.

BERTHILLER, F. et al. Masked mycotoxins: a review. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, p. 165-186, 2013.

BITTENCOURT, C. et al. A cadeia produtiva da maçã em Santa Catarina: competitividade segundo produção e *packing house*. **Revista de Administração Pública**, v. 45, n.4, 2011.

BIZ et al., a. Pectinase activity determination: An early deceleration in the release of reducing sugars throws a spanner in the works! **Plos One**, v. 10, 2014.

BRAGANTE. **Tecnologia do Processamento de Alimentos**: Processo de Gelificação em Alimentos. 2009. Disponível em: < <http://abgtec.alim.yolasite.com/resources/Processo%20de%20Gelifica%C3%A7%C3%A3o%20em%20Alimentos.pdf> >. Acesso em: 18 dez. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União nº. 37**, Brasília, Distrito Federal, 22 de fevereiro de 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº. 54, de 07 de outubro de 2014. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre enzimas e preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral. **Diário Oficial da União nº. 194**, Brasília, Distrito Federal, 08 de outubro de 2014.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial – v. 1 Fundamentos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008.

BONETI, J. et al. Evolução da cultura da macieira. In: EPAGRI **A cultura da macieira**. Florianópolis, Epagri, p. 37-57, 2006.

BRACKMANN, A. et al. **Maçã Pós-Colheita: Armazenamento Refrigerado**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 58-66. (Frutas do Brasil; 39).

BRACKMANN, A. et al. Manutenção da qualidade pós-colheita de maçãs ‘Royal Gala’ e ‘Galaxy’ sob armazenamento em atmosfera controlada. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2478-2484, 2008.

BRACKMANN, A.; HUNSCHE, M.; STEFFENS, A. A. Conservação da maçã ‘fuji’ sob diferentes temperaturas, umidades relativas e momentos de instalação da atmosfera de armazenamento. **Ciência Rural**, v. 30, n. 01, 2000.

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

BRANDÃO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. **Polímeros**, v. 9, n. 3, p. 38-44, 1999.

CAVALCANTE, B. D. M.; AMANTE, E. R. **Enzima pectinolítica a partir de maçãs deterioradas**. Pedido de privilégio de invenção encaminhado para a Secretaria de Inovação da UFSC, 2018.

CELLI, M. G. et al. Patulina: incidência e controle em derivados de maçã. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 135-162, 2009.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de Frutas e Hortaliças: Fisiologia e Manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION – CODEX. **Code of practice for the prevention and reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages**. FAO/WHO, 2003.

COMISSÃO EUROPEIA. **Regulamento (CE) nº. 1881**, de 19 de dezembro de 2006. Fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes em produtos alimentícios. Disponível em: < <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1881/oj> >. Acesso em: 22 nov. 2018.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro: FAPERJ, 2008.

COLLMER, A.; RIED, J. L.; MOUNT, M.S. Assay methods for pectic enzymes. **Methods in Enzymology**, v. 161, p. 329-335, 1988.

CÓRDOVA, K. R. V. **Desidratação osmótica e secagem convectiva de maçã Fuji comercial e industrial**. 2006. 148 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 2006.

COURI, S.; DAMASO, M. C. T. **Árvore do Conhecimento Tecnologia de Alimentos - Enzimáticos. Agência Embrapa de Informação Tecnológica**. Disponível em: < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/a >

[rvore/CONT000fid5sgif02wyiv80z4s473v6o7sud.html](http://www.embrapa.br/CONT000fid5sgif02wyiv80z4s473v6o7sud.html) >. Acesso em: 22 nov. 2018.

DAMASO, M. C. T.; COURI, S. **Árvore do Conhecimento Tecnologia de Alimentos - Fermentação. Agência Embrapa de Informação Tecnológica**. Disponível em: <
http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/avore/CONT000fid5sgif02wyiv80z4s4737dnfr3b.html >. Acesso em: 26 fev. 2019.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DEWAN, S. S. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. **BBC Research Report**. p. 132-146, 2016.

DI PIETRO, P. et al. Breast cancer in southern Brazil: association with past dietary intake. **Nutrición Hospitalaria**, v. 22, p. 565-72, 2007.

DHILLON, G. S.; KAUR, S.; BRAR, S. K. Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 789-805, 2013.

DRUSCH, S. et al. Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 192-197, 2007.

FANTE, C. A. **Caracterização, qualidade e conservação pós-colheita de maçã 'Eva' (*Malus sp.*)**. 2011. 107 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. Produção agrícola mundial. Disponível em: <
<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> >. Acesso em: 29 nov. 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Guidance for FDA components and industry apple juice, apple juice concentrates, and apple juice products: adulteration with Patulin**. Gaithersburg: AOAC International, 2001. 16p.

GARCIA, D. et al. Intraspecific variability of growth and patulin production of 79 *Penicillium expansum* isolates at two temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 195-200, 2011.

GARCIA, V. et al. Dietary intake of flavonoids and asthma in adults. **European Respiratory Journal**, v. 26, p. 449-452, 2005.

GERALDA-SILVA, E. et al. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 859-865, 2005.

GIRARDI, C.; BRACKMANN, A.; PARUSSOLO, A. **Maçã Produção: Colheita e Armazenamento**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p.148-154. (Frutas do Brasil; 37).

GIRARDI, C. et al. Conservação da Qualidade Pós-colheita de Maçãs. **Embrapa Circular Técnica 114**, Embrapa Uva e Vinho. Bento Gonçalves, 2015.

GRANERO, J. C. et al. Mudanças no perfil do bagaço de maçã tratado com enzimas industriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 06, n. 02. P. 864-875, 2012.

GRUPO FISCHER S/A. **Packing House – armazenagem/logística**. Disponível em: <
http://www.grupofischer.com.br/fischer/fischer/sites/fischer/fraiburgo/processamento/packingHouse/armazenagem_logistica.html>. Acesso em: 23 set. 2017.

GUMMANDI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases – A Review. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 987-996, 2003.

HARRIS, T.K.; KESHWANI, M. M. Measurement of Enzyme Activity. **Methods in Enzymology**, v. 463, 2009.

HAMMAMI, W. et al. Patulin and patulin producing *Penicillium* spp. occurrence in apples and apple-based products including baby food. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 11, n. 04, p. 343-349, 2017.

HARTWIG, N.; KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E. Dry fruit as source of fungal contaminants or functional compounds. **Food Science and Technology**, 2019.

HENDGES, D. H. et al. Production and characterization of endo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* in solid-state fermentation in double-surface bioreactor. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 02, p. 253-258, 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: IAL, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção Agrícola Municipal 2009-2015**. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Levantamento Sistêmico da Produção Agrícola**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p. 1-81, 2017.

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

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

JONES, A. L.; ALDWINCKLE, H. S. (Ed.). **Compendium of Apple and Pear Diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1990. 100 p.

JOSHI, V. K.; SANDHU, D. K. Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace. **Bioresource Technology**, v. 56, n. 2-3, p. 251-255, 1996.

JOSHI, V. K.; PARMAR, M.; RANA, N. Purification and characterization of pectinase produced from Apple pomace and evaluation of its efficacy in fruit juice extraction and clarification. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 02, n. 02, p. 189-197, 2011.

- KADER, A. A. Modified atmospheres during transport and storage. **Postharvest Technology of Horticultural Crops**, p.135-144, 2002.
- KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.
- KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum termophile*. **Bioresource Technology**, v. 94, n.3, p.239-43, 2004.
- KIST, B. B. et al. **Anuário Brasileiro da Maçã 2017**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2016. 56 p.
- KOVALESKI, A., RIBEIRO, L. G., Manejo de pragas na produção integrada de maçãs. In: PROTAS, J. F. S.; SANHUEZA, R. M. V. **Produção integrada de frutas: o caso da maçã no Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p. 61-76, 2003.
- KO, S. et al. Comparison of the antioxidant activities of nine different fruits in human plasma. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, p. 41-46, 2005.
- KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 62, n. 2, p. 410-412, 1997.
- KWEON, H. J. et al. Fruit maturity, controlled atmosphere delays and storage temperature affect fruit quality and incidence of storage disorders of 'Fuji' apples. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 157, p. 60-64, 2013.
- LAI, C. L. et al. Detection of mycotoxin patulin in apple juice. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 8, n. 2, p. 85-96, 2000.
- LEE, D.; REDFERN, O.; ORENGO, C. Predicting protein function from sequence and structure. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 8, n.12, p. 995-1005, 2007.

LERESCHE, J. E.; MEYER, H. P. Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): some thoughts of a chemist and a biotechnologist. **Organic Process Research & Development**, v. 10, p. 572-580, 2006.

LEGGOTT, N. L.; SHEPHARD, G. S. Patulin in South African commercial apple products. **Food Control**, v. 12, n. 2, p. 73-76, 2001.

LI, S. et al. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, 2012.

LIMA, M. A. C. **Teor de sólidos solúveis**. Disponível em: < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia22/AG01/arvore/AG01147_24112005115227.html >. Acesso em: 06 dez. 2018.

LIU, B. et al. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins patulin and citrinin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 191, n. 3, p. 255-263, 2003.

LIU, R. H.; LIU, J.; CHEN, B. Apples prevent mammary tumors in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2341-2343, 2005.

LOTITO, S. B.; FREI, B. The increase in human plasma antioxidant capacity after apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate, not apple-derived antioxidant flavonoids. **Radical Biology and Medicine**, v. 37, p. 251-258, 2004.

MALVESSI, E. SILVEIRA, M. M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 693-702, 2004.

MARTINS, N. et al. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 813-819, 2004.

MARTINS, C. R. et al. Fisiopatias e fitopatias em pós-colheita de maçãs produzidas em diferentes sistemas de produção nas safras de 2002 e

2003. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 2, n. 1, p. 1438-1441, 2007.

MENNITI, A. M.; NERI, F.; GREGORI, R.; MACCAFERRI, M. Some factors influencing patulin production by *Penicillium expansum* in pome fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 2183-2187, 2010.

MELLO, L. M. R. Produção e mercado brasileiro de maçã. **Comunicado Técnico nº. 50**, Embrapa Uva e Vinho. Bento Gonçalves, 2004.

MICHALECKA, M. et al. Identification of *Neofabraea* species causing bull's eye rot of apple in Poland and their direct detection in apple fruit using multiplex PCR. **Plant Pathology**, p. 1-12, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOAKE, M. M.; PADILLA-ZAHOUR, O. I.; WOROBO, R. W. Comprehensive review of patulin control methods in foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 4, p. 8-21, 2005.

MOHSEN, S. M.; BAZARAA, W. A.; DOUKANI, K. Purification and characterization of *Aspergillus niger* U-86 polygalacturonase and its use in clarification of pomegranate and grape juices. In: **Proceedings of the 4th Conference on Recent Technologies in Agriculture**, Cairo, Giza, Egypt, 2009.

MORALES, H. et al. Cold and ambient deck storage prior to processing as a critical control point for patulin accumulation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 2, p. 260-265, 2007.

MOSTAFAVI, H. A. et al. Integrated effect of gamma radiation and biocontrol agent on quality parameters of apple fruit: an innovative commercial preservation method. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 91, p. 193-199, 2013.

MUTLU, M. et al. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. **Journal of Food Engineering**, v. 41, p. 147–150, 1999.

NIGAM, P. S. Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. **Biomolecules**, v. 3, p. 597-611, 2013.

PANDA, S. K.; MISHRA, S.; KAYITESI, E.; RAY, R. Microbial processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes. **Environmental Research**, v. 146, p. 161-172, 2016.

PEREIRA, L. B.; SIMIONI, F. J.; CARIO, S. A. F. **Evolução da produção de maçã em Santa Catarina: novas estratégias em busca de maior competitividade**. Florianópolis, 2007. Mimeografado.

PETRI, J. L. et al. Avanços na cultura da macieira no Brasil. **Revista Brasileira da Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 48-56, 2011.

PEŠICOVÁ, K. et al. Diversity and identification of *Neofabraea* species causing bull's eye rot in the Czech Republic. **European Journal of Plant Pathology**, p. 1-11, 2016.

PINHO, M. M. **Validação de método e estudo de ocorrência de patulina em frutas de clima temperado**. 2014. 77 f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2014.a, PR. 2006.

POLETTTO, P. et al. Downstream processing of pectinase produced by *Aspergillus niger* in solid state cultivation and its application to fruit juices clarification. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 02, p. 391-397, 2015.

PUEL, O.; GALTIER, P.; OSWALD, I. P. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. **Toxins**, v. 2, p. 613-631, 2010.

RECH, S.; CARIO, S.; AUGUSTO, C. Avaliação conjuntural da produção e comercialização da maçã em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul: aspectos comparativos. **Indicadores Econômicos FEE**, Porto Alegre, v. 42, n. 1, p. 89-106, 2014.

REETZ, E. et al. **Anuário Brasileiro da Fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2015. 104 p.

RESENDE, M. L. V.; MACHADO, J. C. **Manejo de Doenças em Pós-Colheita de Produtos Vegetais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 182p.

REYES, F. Manejo de cosecha y postcosecha de manzanas ‘Braeburn’. **Revista Frutícola**, Curico, Chile, v. 15, n. 3, p. 95-101, 1994.

RYCHLIK, M.; SCHIEBERLE, P. Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread. **European Food Research and Technology**, v. 212, p. 274-278, 2001.

ROSA, C. G. **Síntese e caracterização de nanopartículas de zeína carregadas com óleos essenciais para aplicação em filmes nanocompósitos de poli (óxido etileno)**. 2016. 132 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

SAQUET, A. et al. Armazenamento de maçã “Gala” sob diferentes temperaturas e concentrações de oxigênio e gás carbônico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 399-405, 1997.

SANHUEZA, R. M. **Maçã Fitossanidade: Doenças Causadas Por Fungos E Bactérias**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004a. p. 34-60. (Frutas do Brasil; 38).

SANHUEZA, R. M. **Maçã Pós-Colheita: Podridões De Maçãs Frigorificadas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004b. p. 35-44. (Frutas do Brasil; 39).

SANHUEZA, R. M.; BETTI, J. A. Doenças da macieira. **In: Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 421-433, 2005.

SANHUEZA, R. M.; BOGO, A. *Neofabraea brasiliensis*. **Persoonia**, v. 35, p. 421-433, 2015.

SANTI, L.; BERGER, M.; SILVA, W. O. B. Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. **Caderno Pedagógico**, Lajeado, v. 11, n. 1, p. 130-139, 2014.

SANTOS, I. D. et al. Patulin accumulation in apples under dynamic controlled atmosphere storage. **Food Chemistry**, v. 255, p. 275-281, 2018.

SCHMIDELL NETTO, W. et al. **Biotecnologia Industrial – v. 2 Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

SCHUMACHER, D. M. et al. Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione. **Archives of Toxicology**, v.79, n.2, p.110-121, 2005.

SCHUMACHER, D. M. et al. DNA-DNA cross-links contribute to the mutagenic potential of the mycotoxin patulin. **Toxicology Letters**, v. 166, n.3, p.268-275, 2006.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em Alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998.

SILVA, N. C. C. **Avaliação do processo biotecnológico e determinação das condições de desalcoolização da bebida obtida por fermentação controlada de suco de maçã**. 2004. 120 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, 2016.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-218, 2003.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 95, p. 267-272, 1952.

SONG, Y. et al. Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in

women: a prospective study and cross-sectional analysis. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 24, p. 376-384, 2005.

STATSOFT INC. **STATISTICA** (Data Analysis System) version 10.0. StatSoft Inc., Tulsa, OK, 2010.

STINSON, E. E. et al. Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges and lemons. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 29, n. 4, p. 790-792, 1981.

TANIWAKI, M. H. et al. Migration of patulin in apples. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 8, p. 902-904, 1992.

TAPRE, A. R.; JAIN, R. K. Pectinases: enzymes for fruit processing industry. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 447-453, 2014.

UENOJO, M.; PASTORE, G. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

UGWUANYI, J. O.; OBETA, J. A. N. Pectinolytic and cellulolytic activities of heat resistant fungi and their macerating effects on mango and African mango. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, n. 7, p. 1054-1059, 1999.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. et al. **Características e controle da podridão ‘olho-de-boi’ nas maçãs do Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2006. (Circular Técnica, 66)

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.; SPOLTI, P.; DEL PONTE, E. Controle do inóculo inicial para redução dos danos pela podridão ‘olho-de-boi’ em macieiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1044-1054, 2010.

VILLAS BÔAS, S. G. **Conversão do bagaço de maçã por *Candida utilis* e *Pleurotus ostreatus* visando a produção de suplemento animal**. 2001. 126 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2001.

VIEIRA, F. G. K., et al. Physico-chemical and antioxidant properties of six apple cultivars (*Malus domestica* Borkh) grown in southern Brazil. **Scientia Horticulturae**, v. 112, p. 421-425, 2009.

WELKE J. E. et al. Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels. **Food Control**, v. 20, p. 48-52, 2009.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, n. 17, p. 97-104, 2006.

ZANELLA, K. **Extração da pectina da casca da laranja-pera (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com solução diluída de ácido cítrico**. 2013. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. São Paulo, 2013.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 825-830, 2000.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado de apresentação de trabalho como pôster na VII Semana Acadêmica de Ciência e Tecnologia de Alimentos, intitulado como: “Determinação da atividade enzimática em extratos de maçãs (*Malus* sp.) pelo método do ácido dinitro 3, 5-salicílico (ADNS)”.



ANEXO B – Certificado de apresentação de trabalho como pôster no XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, intitulado como: “Use of deteriorated Fuji apple extract as a potential subtract for pectinolytic enzymes production”, de autoria de “Bianca Darck Melo Cavalcante, Bianca Darck Melo Cavalcante, Nayla E Ferreira Lima, Edna Regina Amante” foi apresentado no XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, de 16 a 19 de setembro de 2018 no Oceania Park Hotel & Convention Center, Florianópolis, Santa Catarina.



ENZITEC 2018
 > > > FLORIPA
 16 A 19 DE SETEMBRO

Certificamos que o Pôster intitulado "Use of deteriorated Fuji apple extract as a potential subtract for pectinolytic enzymes production", de autoria de "Bianca Darck Melo Cavalcante, Bianca Darck Melo Cavalcante, Nayla E Ferreira Lima, Edna Regina Amante" foi apresentado no XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, de 16 a 19 de setembro de 2018 no Oceania Park Hotel & Convention Center, Florianópolis, Santa Catarina.

Florianópolis, 19 de setembro de 2018

Olivia de Sá
 Presidente Enzitec 2018

Belén Truchel
 Presidente Comitê Científico

realização:  UPSC

patrocínio:  CNPq  CAPES  FAPESC  CREA-SC  epelo

patrocínio:  TECNAL  RIBDIA  INFORS WT  novozymes

ANEXO C – Declaração de solicitação de registro de Patente, n. 226529, na Secretaria de Inovação da Universidade Federal de Santa Catarina, para Produção de Enzimas.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
SECRETARIA DE INOVAÇÃO

Avenida Desembargador Vitor Lima, 222 – Loja 03
Prédio Reitoria II, Trindade,
CEP: 88040-400 - Florianópolis, SC, Brasil
Telefone: (48) 3721-2346 E-mail: sinova@contato.ufsc.br

DECLARAÇÃO

DECLARAMOS que recebemos de **Bianca D'arek Melo Cavalcante, Edna Regina Amante** a solicitação de registro de:

- Direito de autor
- Direitos conexos
- Programa de computador
- Patente
- Desenho industrial
- Indicação geográfica
- Topografia de circuito integrado
- Cultivar
- Conhecimento tradicional

cadastrado sob o número **[226529]** nesta Secretaria.

Informamos para os devidos fins que o registro de PI solicitado é referente a temática: **Produção de Enzimas.**

Florianópolis, 04 de setembro de 2018


Márcio Oliveira Buss
Márcio Oliveira Buss
Diretor de Inovação - UFSC
SIAPE - 1455250

ANEXO D – Declaração de aceite para publicação no livro eletrônico "Avanços e Desafios da Nutrição no Brasil 3".



Ponta Grossa, 31 de janeiro de 2019.

DECLARAÇÃO DE ACEITE

Após avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta editora, tenho a honra de informar que o artigo intitulado "CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE MAÇÃ (*MALUS SPP.*) E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA PELO MÉTODO DO ÁCIDO DINITRO 3,5-SALICÍLICO (ADNS)" de autoria de "BIANCA DARCK MELO CAVALCANTE ", foi aprovado e encontra-se no prelo para publicação no livro eletrônico "Avanços e Desafios da Nutrição no Brasil 3" a ser divulgado em maio de 2019.

Agradeço a escolha pela Atena Editora como meio de transmitir ao público científico e acadêmico o trabalho e parabenizo os autores pelo aceite de publicação.

Reitero protestos de mais elevada estima e consideração.


Prot.ª Dr.ª Antonella Carvalho de Oliveira
Editora Chefe
ATENA EDITORA
PREFIXO EDITORIAL ISBN 93243
PREFIXO DOI 10.22533