



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**AÇÃO DA PECTINA METIL ESTERASE E CLORETO DE
CÁLCIO NO ARMAZENAMENTO E CONTROLE DA
PODRIDÃO-MOLE EM PIMENTÃO**

AIRLES REGINA DA COSTA PAIXÃO

2016



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

AIRLES REGINA DA COSTA PAIXÃO

**AÇÃO DA PECTINA METIL ESTERASE E CLORETO DE CÁLCIO NO
ARMAZENAMENTO E CONTROLE DA PODRIDÃO-MOLE EM PIMENTÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Orientador
Prof. Dr. Luiz Fernando G. de Oliveira Jr.

**SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2016**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

P149a Paixão, Airles Regina da Costa
 Ação da pectina metil esterase e cloreto de cálcio no armazenamento e controle
 da podridão-mole em pimentão / Airles Regina da Costa Paixão ; orientador Luiz
 Fernando G. de Oliveira Jr.. – São Cristóvão, 2016.
 48 f. : il.

 Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade
Federal de Sergipe, 2016.

 1. Agricultura. 2. Pimentão – Armazenamento – Doenças e pragas. 3. Pectina.
4. Erwinia. 5. Fisiologia pós-colheita. I. Oliveira Júnior, Luiz Fernando Ganassali
de, orient. II. Título.

CDU 635.649

AIRLES REGINA DA COSTA PAIXÃO

**EFEITO DA PECTINA METILESTERASE E CLORETO DE CÁLCIO NA
MANUTENÇÃO DA FIRMEZA E CONTROLE DA PODRIDÃO-MOLE EM
PIMENTÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

APROVADA em 22 de Fevereiro, 2016.

Prof. Dr. Adriano do Nascimento Simões
UFRPE

Prof. Dr. Marcelo Augusto G. Carnelosi
UFS



Prof. Dr. Luiz Fernando Ganassali de Oliveira Jr.
UFS
(Orientador)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

*Ao meu avô Manoel Alves Paixão
(In memoriam)*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças para continuar persistindo, sempre mostrando uma luz no final do túnel.

Aos meus queridos pais Gerônimo e Ildaci, mesmo estando uns 190 km longe de mim, me proporcionam forças e amor. Não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Aos meus irmãos que sempre me incentivaram para continuar lutando pelos meus objetivos.

Ao meu noivo Tiago pelo companheirismo, carinho, paciência e todo amor. Sempre ajudando em tudo e todas as dificuldades encontrada nesse caminho.

As minhas amigas Fabiany e Priscilla que desde a graduação estão presentes nessa jornada, entramos em mais um desafio juntas, o mestrado, onde adquirimos conhecimentos tanto profissional quanto para a vida pessoal.

Ao meu orientador Dr. Luiz Fernando Ganassali de Oliveira Júnior, pela paciência e ensinamentos passados, ao Dr. Marcelo Carnelossi por me auxiliar nas horas de dúvidas e ter cedido seu laboratório para algumas práticas. Ao professor, Dr. Paulo Glaguardi, me auxiliando na área da fitopatologia. A PhD. Roberta Samara por seus incentivos e palavras sábias. A colega Mrs. Mayra Barreto por ter me ensinado as práticas de laboratório no início do projeto.

Enfim, aos colegas de laboratório do ECOPOC-UFS, Marcelle, Amanda, Patrícia, Hugo, João Tiago, Fábio e ao técnico Ricardo, que me ajudaram na montagem do experimento e nas análises diárias. Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1. O pimentão	2
2.2. Perdas e Pós-colheita do pimentão	3
2.3. Mudanças na estrutura da parede celular e amadurecimento do pimentão	3
2.4. <i>Pcc</i> na pós-colheita do pimentão	4
2.5. Ação da PME (E.C.3.1.1.11) no amolecimento de fruto	5
2.6. Uso de cálcio na pós-colheita de frutos e hortaliças	6
3. CONCLUSÕES GERAIS	7
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
5. ARTIGO 1: EFEITO DA PECTINA METIL ESTERASE E CLORETO DE CÁLCIO NA MANUTENÇÃO DA FIRMEZA DO PIMENTÃO	14
Resumo	14
Abstract	15
5.1. Introdução	15
5.2. Material e Métodos	16
5.3. Resultados e Discussão	17
5.4. Conclusões	21
5.5. Referências Bibliográficas	21
6. ARTIGO 2: UTILIZAÇÃO DE CLORETO DE CÁLCIO NO CONTROLE DA PODRIDÃO-MOLE EM PIMENTÃO	27
Resumo	27
Abstract	28
6.1. Introdução	28
6.2. Material e Métodos	29
6.3. Resultados e Discussão	30
6.4. Conclusões	31
6.5. Referências Bibliográficas	31
ANEXOS	35

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
5.1	ARTIGO 1	
5.1	Porcentagem de perda de massa fresca em pimentões submetidos aos tratamentos ■ – Sem infusão (SI), ♦ - infusão em água (I), ● - infusão em cloreto de cálcio (Ca) e ▲ - infusão em PME+CaCl ₂ (PME+Ca) armazenados ao longo de doze dias a 20°C ± 1°C em B.O.D. As médias seguidas pela mesma letra minúscula no tratamento e maiúscula no período de armazenamento não diferem significativamente entre si pelo teste de tukey $p \leq 0,05$	18
5.2	Firmeza em pimentões submetidos aos tratamentos ■ – Sem infusão (SI), ♦ - infusão em água (I), ● - infusão em cloreto de cálcio (Ca) e ▲ - infusão em PME+CaCl ₂ (PME+Ca) armazenados ao longo de doze dias a 20°C ± 1°C em B.O.D. As médias seguidas pela mesma letra minúscula no tratamento e maiúscula no período de armazenamento não diferem significativamente entre si pelo teste de tukey $p \leq 0,05$	18
5.3	Atividade de pectina metil esterase (ATPME) pimentões submetidos aos tratamentos ■ – Sem infusão (SI), ♦ - infusão em água (I), ● - infusão em cloreto de cálcio (Ca) e ▲ - infusão em PME+CaCl ₂ (PME+Ca) armazenados ao longo de doze dias a 20°C ± 1°C em B.O.D. As médias seguidas pela mesma letra minúscula no tratamento e maiúscula no período de armazenamento não diferem significativamente entre si pelo teste de tukey $p \leq 0,05$	20
6.1	ARTIGO 2	
6.1	Firmeza (a) e PME (b) em pimentões submetidos aos tratamentos ■ - SI (sem infusão, sem Pcc), - - SI+Pcc (sem infusão e com Pcc) ♦ - I+Pcc (infusão com água e a Pcc), ● - Ca+Pcc (infusão com cloreto de cálcio e com Pcc) e ▲ - PME+Ca+Pcc (infusão com pectina metil esterase+cloreto de cálcio e com Pcc) armazenados ao longo de doze dias a 20°C ± 1°C em B.O.D. As médias seguidas pela mesma letra minúscula no tratamento e maiúscula no período de armazenamento não diferem significativamente entre si pelo teste de tukey $p \leq 0,05$	34

LISTA DE TABELAS

TABELA		Página
5.1	ARTIGO 1	
5.1	Cor da casca em pimentões submetidos aos tratamentos sem infusão (SI), infusão em água (I), infusão em cloreto de cálcio (Ca) e infusão em pectina metil esterase+CaCl ₂ (PME+Ca) armazenados ao longo de doze dias a 20°C ± 1°C em B.O.D. As médias seguidas pela mesma letra minúscula no tratamento e maiúscula no período de armazenamento não diferem significativamente entre si pelo teste de tukey $p \leq 0,05$	25
5.2	Teor de sólido sólúveis totais (%), pH e acidez total (%), nos tratamentos sem infusão (SI), infusão em água (I), infusão em cloreto de cálcio (Ca) e infusão em pectina metil esterase com cloreto de cálcio (PME+Ca) em pimentões armazenados ao longo de doze dias a 20°C ± 1°C em B.O.D. e 75% UR	26
6.1	ARTIGO 2	
6.1	Avaliação da severidade da <i>Pcc</i> , de acordo com a escala, 1 = Sem lesão no ponto de inoculação; 2 = Lesões menores que 5 mm; 3 = Lesões entre 5 e 10 mm; 4 = Lesões maiores que 10 mm; 5 = Fruto próximo da degradação e 6 = Fruto degradado. Tratamentos sem infusão sem a <i>Pcc</i> (SI), sem infusão com a <i>Pcc</i> (SI+ <i>Pcc</i>), com infusão em água mais a <i>Pcc</i> (I+ <i>Pcc</i>), com infusão em cloreto de cálcio e a <i>Pcc</i> (Ca+ <i>Pcc</i>) e com infusão em PME + cálcio e a <i>Pcc</i> (PME+Ca+ <i>Pcc</i>)	34

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

PME	Pectina metil esterase
ICC	Infusão em cloreto de cálcio
SI	Sem infusão
CI	Com infusão em água
<i>Pcc</i>	<i>Pectobacterium caratovorum</i> subsp. <i>caratovorum</i>
PG	Poligalacturonase
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
HG	Homogalacturononas
Ca ²⁺	Cálcio
IPME+CC	Infusão em pectina metil esterase associado com cloreto de cálcio
PMF	Perda de massa fresca
FF	Firmeza do fruto
CC	Cor da casca
SS	Sólidos solúveis
AT	Acidez total
ATPME	Atividade de Pectina metil esterase

RESUMO

PAIXÃO, Airles Regina da Costa. **Ação da pectina metil esterase e cloreto de cálcio no armazenamento e controle da podridão-mole em pimentão.** São Cristóvão: UFS, 2016. 48p. (Dissertação – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).*

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) tem grande importância comercial, por possuir fontes de vitaminas, minerais e fibras. Contudo, possui problema pós-colheita, o amolecimento excessivo que reduz a vida útil e favorece ação de patógenos como a *Pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorum*- *Pcc*, agente causal da podridão-mole, uma das principais doenças da pós-colheita do pimentão que é favorecida pela redução da firmeza. Uma técnica que vem sendo utilizada recentemente para a manutenção da firmeza é aplicação da pectina metil esterase (PME) com a adição de solução de cálcio prologando, assim, a sua vida útil e diminuindo o ataque do patógeno. Assim, o objetivo do trabalho foi utilizar a pectina metil esterase (PME) exógena associada ao cloreto de cálcio na manutenção da firmeza e no controle da *Pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorum* sobre o pimentão. O primeiro experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x5 com três repetições, durante 12 dias, avaliados a cada 3 dias. No segundo experimento, o ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 5x5 com três repetições. No primeiro trabalho os frutos de pimentão foram submetidos ao método de infusão a vácuo com pressão de 200 mmHg por 5 minutos, e por seguinte avaliou-se a perda de massa fresca (PMF), firmeza do fruto (FF), cor da casca (CC), teor de sólidos solúveis (SS), pH, acidez total, (AT) e atividade de PME. No segundo ensaio os frutos de pimentão foram submetidos ao método de infusão a vácuo com pressão de 200 mmHg por cinco minutos, posteriormente os frutos foram inoculados com a *Pcc* em seguida realizou-se as análises de firmeza do fruto (FF), atividade de PME e a severidade da doença no pimentão (SD). Os frutos obtiveram de forma geral uma redução da firmeza ao longo do tempo em todos os tratamentos, porém foi verificado o efeito significativo na manutenção da firmeza dos frutos quando tratados em infusão a vácuo com cloreto de cálcio, não alterando as características físico-químicas, como o teor de sólidos solúveis, acidez total e atividade de PME, retardando o processo de amadurecimento do fruto. Os frutos quando tratados com infusão a vácuo com cloreto de cálcio associado à pectina metil esterase não foi favorável, pois alterou as propriedades físico-químicas do pimentão, com destaque para o declínio da firmeza, deteriorando assim a qualidade do fruto. Em relação à inoculação da *Pcc* no fruto, observou-se uma inibição do crescimento desse patógeno, prolongamento do fruto e uma melhor firmeza nos frutos tratados com infusão de cloreto de cálcio mais a inoculação da *Pcc*.

Palavras-chave: *Capsicum annuum* L., enzima PME, cálcio, pós-colheita, *Pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorum*- *Pcc*.

* Comitê Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Ganassali de Oliveira Jr. – UFS (Orientador)

ABSTRACT

PAIXÃO, Airles Regina da Costa. **Pectin methyl esterase action and calcium chloride in the storage and control of soft rot in pepper.** São Cristóvão: UFS, 2014. 48p. (Thesis - Master of Science in Agriculture and Biodiversity).*

The pepper (*Capsicum annuum* L.) has commercial importance, by having sources of vitamins, minerals and fiber. However, a post-harvest problem, excessive softening which reduces the life and favors action pathogens such as *Pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorum*- Pcc, causal agent of soft rot, a major disease of post-harvest chili that is favored by the reduction of firmness. One technique that has recently been used for firmly maintaining the application is pectin methyl esterase (PME) with the addition of a calcium solution prologando thus reducing its lifetime and pathogen attack. The objective of this study was to use methyl pectin esterase (PME) exogenous associated with calcium chloride in maintaining firmness and control of *Pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorum* about pepper. The first experiment was conducted in a completely randomized design in a 4x5 factorial scheme with three replications for 12 days, evaluated every three days. In the second experiment, the test was conducted in a completely randomized design in a factorial 5x5 with three replications. In the first study the fruits of pepper were subjected to vacuum infusion method with pressure of 200 mmHg for 5 minutes, and following evaluated the loss of weight (PMF), fruit firmness (FF), skin color (CC), soluble solids (SS), pH, total acidity (TA) and activity of SMEs. In the second test the fruits of pepper were subjected to vacuum infusion method with pressure of 200 mmHg for five minutes, then the fruits were inoculated with the PCC then held the fruit firmness analysis (FF), SME activity and the severity of the disease in chili (SD). The fruits obtained in general a reduction of over time firmly in all treatments but was found significant effect in maintaining the fruit firmness when treated in vacuum infusion with calcium chloride, without altering the physicochemical characteristics, as soluble solids content, total acidity and activity of SMEs, slowing the fruit ripening process. The fruits when treated with vacuum infusion with calcium chloride associated with pectin methyl esterase was not favorable because it altered the physicochemical properties chili, highlighting the decline of firmness, thus deteriorating the quality of the fruit. Regarding inoculation Pcc in the fruit was observed inhibition of growth of this pathogen, prolongation of fruit and better firmness treated fruits infusion over calcium inoculation Pcc chloride.

Key-words: *Capsicum annuum* L., PME enzyme, calcium, post-harvest, *Pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorum*- Pcc.

* Supervising Committee: Prof. Dr. Luiz Fernando Ganassali de Oliveira Jr. – UFS (Orientador)

1. INTRODUÇÃO GERAL

O pimentão está entre as dez hortaliças mais consumidas do Brasil; e desempenha um papel importante na alimentação humana por ser rico em nutrientes e vitaminas. Seus frutos são comercializados, principalmente, na coloração verde, vermelha e amarela (CASALI e COUTO, 1984; FILGUEIRA, 2008).

Durante a pós-colheita do pimentão podem ocorrer alterações das propriedades organolépticas especialmente na firmeza, devido a alterações na lamela média da parede celular, a perda de firmeza na parede do pimentão pode ser porta de entrada para patógenos, como a *Pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorum*- *Pcc*, (Jones) Hauben et al. (sin. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) (JABUONSKI et al., 1986) agente causal da podridão-mole na pós-colheita desta cultura.

A podridão-mole causa a degradação da parede celular por enzimas extracelulares incluindo pectinases, proteases e celulases, que liberam nutrientes para o crescimento da bactéria (PÉROMBELON e VAN DER WOLF, 2002).

As enzimas pectina metil esterase (PME) (EC 3.1.1.11) e poligalacturonase (PG) (EC 3.2.1.15) estão envolvidas na degradação da pectina e outros materiais de parede celular na qual hidrolisa grupos metil esterificados de resíduos de ácido galacturônico presentes nas homogalacturononas (HG). Desta forma, há liberação de metanol e ácidos carboxílicos livres na pectina (JOLIE et al., 2010), resultando em um fruto menos firme de menor qualidade. Uma vez que a firmeza do pimentão depende da integridade estrutural da parede celular.

Para a manutenção da firmeza e a inibição da *Pcc*, vem se utilizado técnicas como a aplicação de sais de cálcio, também cálcio associados a enzimas, para estender a vida útil do fruto e diminuir a atividade das enzimas envolvidas no amolecimento pois o cálcio se fixa aos radicais das enzimas, formando o pectato de cálcio reduzindo o amolecimento do fruto (GOMES et al., 2005; FRAEYE et al., 2009).

A infusão da PME exógena combinados com Ca^{2+} pode minimizar a deterioração da parede celular de diferentes frutos. (DEGRAEVE et al., 2003; DURVETTER et al., 2005). Frutas e hortaliças tratados com cálcio tornam-se mais firmes durante o armazenamento (SUUTARINEN et al., 1999; LUNA-GUZMÁN et al., 2000). Além disso, a aplicação de cálcio minimizam o aparecimento da podridão-mole em couve-chinesa, alface (FELIX, 2012), tomate (GOMES et al., 2005) e batata (NGADZE et al., 2014).

Sendo assim o objetivo do presente trabalho foi utilizar a pectina metil esterase (PME) exógena associada ao cloreto de cálcio na manutenção de firmeza e no controle da *Pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorum* sobre o fruto de pimentão.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. O pimentão

O pimentão *Capsicum annuum* L., é de origem americana, família solanaceae e ocorre de formas silvestres desde o sul dos Estados Unidos até o norte do Chile. Entretanto, tem sido cultivada desde regiões tropicais até as regiões temperadas (CASALI e COUTO, 1984; FILGUEIRA, 2008). As espécies desse gênero podem ser divididas com base no processo de domesticação, sendo que as espécies domesticadas são: *C. annum*, *C. chinese*, *C. pubescens*, *C. bacatum* e *C. frutescens* (MONGKOLPORN e TAYLOR, 2011), possui uma taxonomia extensa, devido a uma grande variabilidade de formas existentes e a diversidade de critérios utilizados para sua classificação (MOREIRA, 2012).

Cultivado e consumido pelos indígenas séculos antes da colonização espanhola. Foi introduzido na Espanha em 1493, de onde sua cultura expandiu-se ao longo do século XVI para outras nações da Europa, Ásia e África, tornando-se um alimento apreciadíssimo (FILGUEIRA, 2003).

O pimentão foi introduzido inicialmente nos municípios de Mogi das Cruzes e Suzano no Estado de São Paulo. Esse grupo produz o tipo de fruto preferido pela maioria dos consumidores, com formato aproximadamente cônico, ligeiramente alongado e coloração verde-escura (HENZ et al., 2000).

A espécie *C. annum* engloba tanto as pimentas como os pimentões (CASALI e COUTO, 1984). O fruto de pimentão apresenta-se em forma de baga oca, de formato cônico ou cúbico, com ausência de sabor picante e pungente, o que os diferenciam das pimentas, devido à ausência do alcaloide capsicina (FILGUEIRA, 2008).

A planta do *C. annum* é arbustiva, com caule semilenhoso, podendo ultrapassar 1 m de altura, suporta uma carga leve de frutos e as flores são pequenas, isoladas e hermafroditas. Possui uma corola de 15 mm de diâmetro e, em média, seis anteras tubulares apresentando deiscência lateral (FREE, 1993).

A cultura do pimentão possui uma grande importância, pois apresenta elevado valor comercial estando classificadas entre as dez hortaliças mais consumidas no Brasil (FILGUEIRA, 2008). É uma hortaliça importante na alimentação humana, como fonte de minerais, vitaminas e fibras tendo uma importância para a digestão humana e o seu consumo está associado à prevenção de doenças como a diabetes e a obesidade (LIU, 2003).

Segundo Wierzbicki (2004), o pimentão é uma hortaliça rica em vitamina A, vitamina C e potássio que proporciona assim importantes propriedades, destacando-se o sabor determinado pela estimulação de sensibilidade química do consumidor ao aroma e sabor aos quais se originam dos constituintes básicos, como carboidratos, proteína, gorduras, vitaminas e minerais (LEMOS, 2006).

Os tipos mais consumidos de pimentão são os de coloração verde-escura brilhante, com uma boa firmeza e que apresentam um desenvolvimento máximo (MEDINA, 1984). À medida que o fruto amadurece, ocorre a degradação da clorofila, oxidação de substratos, hidrólise do amido e o rompimento de membranas, levado ao envelhecimento e a morte dos tecidos (CHITARRA e CHITARRA, 2005). As tecnologias desenvolvidas para a cultura do pimentão estão voltadas para a melhoria da produtividade e da aparência dos frutos, sem considerar aspectos como sabor, valor nutricional (ROCHA et al., 2006).

A qualidade de frutos e hortaliças é caracterizada com base em atributos como aparência, sabor, textura e valor nutritivo, por apresentar uma grande importância para a qualidade química e física do produto e a longevidade durante o processo de comercialização (CHITARRA, 1998).

2.2. Perdas pós-colheita do pimentão

As perdas em pós-colheita de frutos e hortaliças ocorrem, desde a sua produção, comercialização e por final sob os cuidados dos consumidores, variando entre 25 % a 80 %, dependendo do produto e da tecnologia aplicada. (FERREIRA et al., 2008).

A qualidade das hortaliças comercializadas no Brasil geralmente, não é satisfatória, principalmente pela falta de técnicas que possam suprir as condições na pós-colheita, uma vez que, a qualidade de um fruto seja consumido fresco ou processado, vai depender de inúmeros fatores, como temperatura elevadas, transportes inadequados. (DAMMATO JUNIOR et al., 2010). Portanto seria viável uma redução nas perdas através de soluções que buscam uma quantidade considerável de capital e de tempo para que haja uma redução nas perdas pós-colheita (OLIVEIRA, 2012).

Na fase da pós-colheita, os pimentões trazem do campo uma carga elevada de microrganismos, que dependendo do manuseio ao qual o produto é submetido, tende a multiplicar-se, e conseqüentemente, provocar a deterioração dos frutos. Fatores como, temperatura e umidade elevadas favorecem o desenvolvimento de doenças pós-colheita, no qual patógenos específicos encontram condições favoráveis para o seu estabelecimento após o enfraquecimento dos tecidos vegetais pela ação do processo de maturação ou senescência ou pela ação da injúria provocada pelo frio (CARVALHO, 2006).

As frutas e hortaliças “in natura” são altamente perecíveis e vários são os problemas relacionados à sua conservação, que vêm desde o momento em que são colhidas, quando se dá um início a uma série de processos que influenciam na qualidade do produto e nas suas conseqüentes perdas, até que o mesmo chegue ao consumidor (LEMOS, 2006). Da mesma forma Carmo (2004) observou entre as principais causas de perdas na pós-colheita estão à falta de transporte adequado, e a utilização da temperatura inadequada para a conservação.

A redução de doenças em pós-colheita é um dos grandes desafios para minimizar as perdas, ultimamente este controle tem sido à base de defensivos agrícolas, e tratamentos físicos associados ao controle químico. No entanto, a crescente exigência por produtos vegetais de qualidade, livres de contaminação por microrganismos e resíduos químicos, restringe o uso de defensivos agrícolas em pós-colheita. E com isso, tem incrementado o desenvolvimento de pesquisas que buscam métodos alternativos químicos, físicos e biológicos para controlar doenças da pós-colheita (MARI e GUIZZARDI, 1998).

A aplicação de sais de cálcio, por exemplo, reduzem as desordens fisiológicas, atraso na senescência e inibição de podridões na pós-colheita, devido à habilidade deste íon em se ligar às pectinas da parede celular, o que dificulta a degradação da mesma por meio de enzimas pectolíticas produzidas por patógenos, como é o caso de *Pcc* no pimentão (GOMES et al., 2005).

Dessa forma, métodos alternativos de manejo na pós-colheita vêm sendo pesquisados em diversas culturas, destacando-se a utilização de fosfitos, usos de enzimas, fontes de cálcio, bem como o uso de leveduras e bactérias antagonistas em tomates, alface e batatas (GOMES et al., 2005; FELIX, 2012; NGADZE et al., 2014).

2.3. Mudanças na estrutura da parede celular e amadurecimento do pimentão

A parede celular é constituída por uma complexa mistura de polissacarídeos, os quais estão ligados covalentemente e não covalentes divididos em parede primária, secundária e terciária (TAIZ e ZEIGER, 2013). Em frutos há predominância na maioria das vezes da parede celular primária: caracterizada por menor quantidade de substâncias pécticas, menor deposição de suberina, composta por microfibrilas de celulose embebida numa matriz de polissacarídeos de glicanos (hemiceluloses), substâncias pécticas, proteínas estruturais e enzimáticas, íons minerais e alguns compostos fenólicos (PAIVA et al., 2009; TAIZ e ZAIGUER, 2009; VALERO e SERRANO, 2010).

A parede celular primária está envolvida e ao mesmo tempo embebida em uma matriz péctica conhecida como lamela média, sendo composta por pectina, proteínas livres e

microfibrilas de celulosas (LEVY et al., 2002; JARVIS et al., 2003; TAIZ e ZEIGER, 2009; MOLINA-HIDALGO et al., 2013).

As pectinas são cadeias de polímeros lineares ou ramificados que têm alto conteúdo de ácidos galacturônicos sendo amplamente secretadas na via Complexo de Golgi quando estão altamente metil esterificadas e direcionadas para a parede celular e que podem ter mais de 17 diferentes monossacarídeos, sendo classificadas em 4 diferentes tipos de estrutura: homogalacturona, rhamnogalacturonas I e II e xylogalacturona (PAIVA et al., 2009; VALERO e SERRANO, 2010; O'DONOVAN et al., 2013).

Ocorre um grande problema pós-colheita nessa cultura, o amolecimento excessivo que pode causar encolhimento e distúrbios fisiológicos que reduzem severamente a qualidade e aceitabilidade do produto (SETHU et al., 1996). Os reflexos econômicos deste amolecimento vêm estimulando o desenvolvimento de pesquisas envolvendo bases bioquímicas do metabolismo da parede celular durante o amadurecimento de frutos.

Durante a fase do amadurecimento do pimentão, uma das principais mudanças observadas é a dissolução da lamela média. Isto dá início a uma diminuição na adesão intercelular, gerado pela dissociação das ligações carboxílicas entre cálcio e cadeias de ácidos poligalacturônicos, gerando um amolecimento do fruto. Tais transformações implicam em modificações de polissacarídeos da parede celular por ação de diversas enzimas pectinolíticas. (EVANGELISTA et al., 2002; AZZOLINI, et al., 2004; VILAS BOAS et al., 2013).

A ação dessas enzimas na degradação da pectina implica no amolecimento dos frutos, dado pelo afrouxamento das células causando uma diminuição na firmeza dos frutos. A perda de firmeza segundo Fils-Lycaon e Buret (1990), Hopkins e Huner (2009) e Yamamoto et al. (2011), tem sido atribuída como modificações no grau de polimerização e composição de açúcares resultando em alterações na sua estrutura e diminuição da resistência no fruto.

Segundo Sethu et al. (1996) durante o amadurecimento do pimentão (*Capsicum annum* L.) ocorre mudanças nas atividades de várias hidrolases da parede celular, sendo que a atividade de poligalacturoase (PG) aumenta, fazendo com que a atividade PME aumente, diminuindo assim, a firmeza do fruto. A atuação da pectinametil esterase resulta no aparecimento de grupos carboxílicos com carga (COO^{-1}), reduzindo o grau de esterificação e aumentando a densidade de cargas negativas ao longo da cadeia de pectina. Assim, aumenta afinidade por ligação com Ca^{+2} . Essa ligação é considerada de natureza cooperativa, pois impede a ação da PG e consequentemente mantém a estrutura da parede celular (BURNS e PRESSEY, 1987).

2.4. Pcc na pós-colheita do pimentão

Algumas doenças, como por exemplo, a podridão mole é relatada como sendo de grande importância nas culturas do pimentão e da pimenta (CARMO et al., 2006; FILGUEIRA 2008; GLOSIER et al., 2008; BNEJDI et al., 2009; MARAME et al., 2010). No entanto, estão sujeitos a problemas fitossanitários que afetam a qualidade e causam grandes perdas na pós-colheita (SILVA et al., 2014). A podridão-mole representa umas das principais doenças do pimentão na pós-colheita, causada pela bactéria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* - *Pcc* (JABUONSKI et al., 1986). É muito comum no Brasil, seja no campo ou na fase de pós-colheita, sendo um fator limitante para o cultivo de olerícolas, como o pimentão. É uma doença que atinge diversas culturas, incluindo couve-chinesa (*Brassica pekinensis* L.) (KIKUMOTO, 1980).

Os sintomas têm início com o aparecimento de pequenas manchas, de aspecto encharcado, deprimido e descolorido, que crescem rapidamente na superfície do fruto (AMORIM et al., 2011). Os sintomas causados por espécies de *Pcc* se devem a produção de grandes quantidades de enzimas que degradam a parede celular das plantas (COLLMER e KEEN, 1986; PIRHONEM et al., 1991; SALMOND, 1994).

O manejo da podridão-mole é muito complexo, uma vez que *Pcc* tem a capacidade de adaptação a uma larga faixa de temperatura que a mantém viável por longos períodos,

sobrevivendo na água, no solo, em restos culturais infectados e na rizosfera de plantas cultivadas ou invasoras (PÉROMBELON e VAN DER WOLF, 2002). Para a redução de desordens fisiológicas, retardamento da senescência e inibição de podridões em pós-colheita, vem se utilizando algumas aplicações de sais de cálcio.

Várias fontes de cálcio já foram testadas no controle da *Pcc*, onde Gomes et al. (2005) Verificaram a eficiência do uso de cálcio para o controle da podridão-mole em tomates. Da mesma forma Silva et al. (2014) e Felix (2012) em pimentão e em couve-chinesa verificaram a redução da incidência da doenças ao aplicar fontes de cálcio quando comparados ao controle.

2.5. Ação da PME (E.C.3.1.1.11) no amolecimento de fruto

A diminuição da firmeza durante o amadurecimento tem sido atribuída a modificações e à degradação dos componentes da parede celular, tais como celulose, hemiceluloses e pectinas (HOPKINS e HUNER, 2009). As substâncias pécticas constituem-se na classe de polissacarídeos da parede celular que sofrem a mais marcante modificação durante o amadurecimento de alguns frutos, com o aumento da solubilização e despolimerização associadas ao amolecimento dos frutos que ocorre através de enzimas (OLIVEIRA et al., 2006).

A enzima PME tem papel importante no amolecimento de frutos pelo aumento *in vivo* da susceptibilidade das pectinas à poligalacturonase (PG) durante o amadurecimento, essa enzima catalisa a desmetilação do carbono seis do grupo carboxílico dos resíduos de galacturosil, desesterificando-os (RESENDE et al., 2004).

O modo de ação da PME é interessante tanto na área vegetal como para a indústria alimentar, pois está relacionada com a susceptibilidade que a homogalacturonanas (HG) tem, sendo um dos componentes principais dos polissacarídeos pécticos, contribuindo para a rigidez assim como a adesão das células, ocorrendo despolimerização enzimática por parte de poligalacturonase (PG) e de pectina liase (PL) assim como a formação de géis de cálcio (WILLATS et al., 2001).

A PME é uma enzima termo lábil sendo inativadas a temperaturas superiores a 70°C. A sua estabilidade térmica depende também do ambiente onde está introduzida (NGUYEN et al., 2002). A PME é menos susceptível ao aquecimento quando está inserida num tecido, assim como a adição de açúcares, aumentando a sua estabilidade (GUIAVARC'H et al., 2003.; PLAZA et al., 2008). Ao contrário do que se sucede com a temperatura, as PME são tolerantes à pressão (NUNES et al., 2006; SILA et al., 2007).

A PME é um das enzimas mais importantes em nível de processamento de vegetais e frutos, devido a presença de enzima endógena que pode influenciar de forma positiva ou negativa na viscosidade e textura, no processamento, no qual é possível controlar a atividade e a estabilidade das diferentes enzimas obtendo qualidades biológicas e firmeza desejada (VAN BUGGENHOUT et al., 2009).

A atuação desta enzima durante o amadurecimento tem sido estudada em muitos frutos principalmente nos climatéricos como kiwi, abacate, pêsego e mamão. Sua ação desmetila, o ácido poligalacturônico tornando-o solúvel na ação de outras enzimas envolvidas no metabolismo da parede celular, ocorrendo a solubilização das protopectinas pela enzima poligalacturonase e liberação do cálcio pela acidificação da parede celular, através de enzimas pectolíticas, resultando no enfraquecimento das ligações dos polissacarídeos da parede pelo deslocamento dos íons de cálcio, com o amadurecimento do fruto (GALLON, 2010).

Segundo Yamamoto et al. (2011) o cálcio ao ligar-se às pectinas, dá origem ao pectato de cálcio, restringindo a ação da PME e PG e consequentemente retardando o amaciamento de frutos.

A importância da PME em conjunto com soluções de cálcio, confirma o retardamento do amaciamento de frutos. Guillemín et al. (2008) evidenciaram aumento significativo da firmeza com a aplicação de PME e cálcio em maçã pasteurizada a vácuo. De acordo com

Galleto et al. (2010) estudaram o efeito da imersão de cloreto de cálcio em morangos, onde analisaram um pré-tratamento com a aplicação por imersão da PME, porém não forneceu qualquer benefício adicional na estabilidade da firmeza do morango.

2.6. Uso de cálcio na pós-colheita de frutos e hortaliças

O cálcio (Ca^{2+}) age na célula atuando como constituinte da lamela média das paredes celulares (TAIZ e ZEIGER, 2013), pois participa ativamente da estrutura da parede celular, na resposta de sinalização celular e na função da membrana que servem como uma ação contrária dentro de organelas de armazenamentos (WHITE e BROADLEY, 2003; HEPLER, 2005).

O cálcio é o nutriente mais frequentemente associado com a qualidade dos frutos e hortaliças em geral e constitui a parede celular dos vegetais. O íon Ca^{2+} liga às pectinas resultantes das cadeias de ácido poligalacturônico. As pontes de cálcio entre os ácidos pécticos ou entre esses e outros polissacarídeos dificultam o acesso e a ação de enzimas pectolíticas que causam amolecimento (MOTA et al., 2002).

Em frutos e em algumas hortaliças, o efeito do cálcio tem recebido muita atenção, visto que as aplicações deste cátion promovem o retardamento da maturação e da senescência (KLAUS, 2007). Sabe-se que para a manutenção da firmeza em frutos de morango, por exemplo, os íons de cálcio tornam-se essenciais, devido às ligações cruzadas entre grupos carboxílicos (CAMARGO et al., 2000).

Segundo Evangelista (2002), a ação da PME em promover sítios de ligações para o Ca^{2+} é importante para a concentração deste íon na lamela média, e a ação de outras enzimas que degradam a parede celular, como a poligalacturonase (PG).

O uso de cálcio aumenta a firmeza dos frutos, como no trabalho de Silva 2014, que analisou o efeito do cloreto de cálcio e do uso de cobertura comestível a base de quitosana na conservação pós-colheita do mamão, no qual observou o efeito significativo na manutenção da firmeza dos frutos quando tratado com cálcio a vácuo.

Angelletti et al. (2010) sobre o efeito da aplicação de cálcio na qualidade pós-colheita, no amolecimento e degradação da parede celular de duas variedades de blueberry (*Vaccinium corymbosum*), observaram que os frutos tratados com cálcio para ambas as variedades apresentavam menor amolecimento e perda de peso do que o tratamento controle.

Carbonato e citrato de cálcio são os principais sais adicionados aos alimentos, a fim de aumentar o valor nutricional (BRANT, 2002). Os sais utilizados na indústria alimentar são o lactato, cloreto, fosfato, propionato, ascorbato e gluconato, quando o objetivo é a preservação ou aumento de vida útil do produto (MANGANARIS et al., 2007; QUILES et al., 2007; AGUAYO et al., 2008).

O cloreto de cálcio tem sido amplamente utilizado como conservante e agente de endurecimento em frutas e em vegetais inteiros e minimamente processados. Chardonnet, et al. (2003) estudaram o efeito do cloreto de cálcio na firmeza de maçã, Luna-Guzman e Barrett (2000) comparou o efeito do cloreto de cálcio e lactato de cálcio na eficácia e manutenção da estabilidade de prateleira e qualidade de melão minimamente processado, onde manteve uma firmeza do melão.

3. CONCLUSÕES GERAIS

O método de infusão a vácuo para o pimentão não foi eficiente devido a sua composição estrutural. Quando se adicionou solutos (CaCl_2) ou enzima (PME) ao método de infusão a vácuo as análises foram mais promissoras.

Sendo que o tratamento mais adequado para se retardar o amadurecimento e a manutenção da firmeza foi o Ca. Para o controle da podridão-mole verificou-se que o uso de solutos como o cloreto de cálcio em infusão foi eficiente para o controle da *Pcc* e manutenção da firmeza.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUAYO, E.; ESCALONA, V.H.; ARTÉS, F. Effect of hot water treatment and various calcium salts on quality of fresh-cut 'Amarillo' melon. **Postharvest Biology and Technology**, v.47, n.3 p. 397–406, 2008.
- AMORIM, L.; REZENDE J.A.M.; BERGAMIN F. **Manual de Fitopatologia**, 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. 705p.
- ANGELLETI, P.; CASTAGNASSO H.; MICELI E.; TERMINIELLO L.; CONCELLÓN, A. CHAVES, A.; VICENTE, A.R. Effect of pre harvest calcium applications on postharvest quality, softening and cell wall degradation of two blueberry (*Vaccinium corymbosum*) varieties. **Postharvest Biology and technology**, v.58, n.2, p.98-103, 2010.
- AZZOLINI, M.; JACOMINO, A.P.; BRON, I.U. Índices para avaliar qualidade pós-colheita de goiabas em diferentes estádios de maturação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.2, p.139-145, 2004.
- BNEJDI, F.; SAADOUN, M.; ALLAGUI, M.B.; EL GAZZAH, E. Epistasis and heritability of resistance to *Phytophthora nicotianae* in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Euphytica**, v.167, n.1, p.39-44, 2009.
- BRANT, L.A. **Calcium the essential mineral**, Formulation and Ingredient Challenges. Available, 2002.
- BURNS, J.K.; PRESSEY, R. Ca^{+2} in cell walls of ripening tomato and peach. **Journal of the American for Horticultural Science**, v.112, n.5, p.783- 787, 1987.
- CAMARGO, Y.R.; LIMA, L.C.O.; SCALON, S.P.Q.; SIQUEIRA, A.C. Efeito do cálcio sobre o amadurecimento de morangos (*Fragaria ananassa* duch.) cultivar Campineiro. Lavras, **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.4, p. 968-972, 2000.
- CARMO, M.G.F.; ZERBINI JÚNIOR, F.M.; MAFFIA, L.A. Principais doenças da cultura da pimenta. **Informe Agropecuário**, v.27, n.235, p.87-98. 2006.
- CARVALHO, J.B. **Potencial fungitóxico de *Cymbopogon citratus*(DC)Staf. e *Cymbopogon martinii*(Roxb.) J.F.Watson a *Colletotrichum* sp. e proteção pós-colheita de frutos de pimentão**. 2006. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá. Curso de Pós-graduação em Agronomia, Maringá- PR, 2006.
- CASALI, U.W.D.; COUTO, F.A.A. Origem e botânica de *Capsicum*. **Informe Agropecuário**, v.10, n.113, p.8-10, 1984.
- CHARDONNET, C.O.; CHARRON, C.S.; SAMS, C.E.; CONWAY, W.S. Chemical changes in the cortical tissue and cell walls of calcium-infiltrated 'Golden Delicious' apples during storage. **Postharvest Biology and Technology** , v.28, n.1, p.97-111, 2003.
- CHITARRA , M.I.F.; CHITARRA A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: Fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL/FAEFE, 1990. 320p.
- CHITARRA, M.I.F. Fisiologia e qualidade de produtos vegetais. In: BORÉM F.M. (Ed.). Armazenamento e processamento de produtos agrícolas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 27.**Anais...** Poços de Caldas: SBEA, p. 1-58, 1998.

- COLMER, A.; KEEN, N.T. The role of pectic enzymes in plantpathogenesis. Ann. **Revista Phytopathology**, v. 24, p. 383-409, 1986
- DAMATTO JUNIOR, E.R.; GOTO, R.; RODRIGUES, D.S.; VICENTINI, N.M.; CAMPOS, A.J. de. Qualidade de pimentões amarelos colhidos em dois estádios de maturação. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v.17, n.1, p.23-30, 2010.
- DEGRAEVE, P.; SAUREL, R.; COUTEL, Y. Vacuum impregnation pretreatment with pectin methylesterase to improve firmness of pasteurized fruits. **Journal of Food Science**, v.68, n.2 p.716–721, 2003.
- DURVETTER, T.; FRAEYE, I.; VAN HOANG, T.; VAN BUGGENHOUT, S.; VERLENT, I.; SMOUT, C. Effect of pectin methylesterase infusion methods and processing techniques on strawberry firmness. **Journal of Food Science**, v.70, n.6, p.383–388. 2005.
- EVANGELISTA, R.M.; CHITARRA, A.B.; CHITARRA, M.I.F. Mudanças na ultra-estrutura da parede celular de mangas 'Tommy Atkins' Tratadas com cloreto de cálcio na pré-colheita. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 254-257, 2002.
- FELIX, K. C.da S. **Manejo da podridão mole em couve-chinesa e alface**. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2012.
- FERREIRA, M.D.; FRANCO, A.T.; FERRAZ, A.C.O.; CAMARGO, G.; TAVARES, M. Qualidade do tomate de mesa em diferentes etapas, da fase de pós-colheita. **Horticultura Brasileira**, v.26, n.2, p.231-235. 2008.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Solonáceas: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, pimenta, berinjela e jiló**. Lavras: UFLA, 2003. 333p.
- FILGUEIRA, F. A.R. **Novo Manual de Olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2 ed. Viçosa: UFV, 2008. 402p.
- FILS-LYCAON, B.; BURET, M. Loss of firmness and changes in pectic fractions during ripening and overripening of sweet cherry. **HortScience**, v.25, n.7, p.777-778. 1990.
- FRAEYE, I.; KNOCKAERT, G.; VAN BUGGENHOUT, S.; DUVETTER, T.; HENDRICKX M.; VAN LOEY, A. Enzyme infusion and thermal processing of strawberries: Pectin conversions related to firmness evolution. **Food Chemistry**, v.114, n.4, p.1371–1379. 2009.
- FREE, J. B. **Insect pollination of crops**. London: Academic Press, 1993. 684p.
- GALLETO, C.D.; VERDINI, R.A.; ZORRILLA, S.E.; RUBIOLO, A.C. Freezing of strawberries by immersion in CaCl₂ solutions. **Food Chemistry**, v.123, n.2, p.243–248, 2010.
- GALLON, C. Z. **Amolecimento precoce da polpa e sua relação com as modificações da parede celular em mamões ‘Golden’**. 2010. Tese (Doutorado na área de fisiologia e bioquímica de plantas)-Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”. Piracicaba-SP, 2010.
- GLOSIER, B.R.; OGUNDIWIN, E.A.; SIDHU, G.S.; SISCHO, D.R.; PRINCE, J.P.A. Differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of Phytophthora capsici. **Euphytica**, v.162, n.1, p.23-30, 2008.

GOMES, A.M.A.; SILVEIRA, E.B.; MARIANO, R.L.R. Tratamento pós-colheita com cálcio e microrganismos para controle da podridão-mole em tomate. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.1, p.108-111, 2005.

GUIAVARC'H Y.; SILA, D.; DUVETTER, T.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX, M., Influence of sugars and polyols on the thermal stability of purified tomato and cucumber pectinmethylesterases: a basis for TTI development. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, n.5, p.544-555, 2003.

GUILLEMIN, A.; GUILLON, F.; DEGRAEVE, P.; RONDEAU, C.; DEVAUX, M.F.; HUBER F.; BADEL, E.; SAUREL, R.; LAHAYE, M. Firming of fruit tissues by vacuum-infusion of pectin methylesterase: Visualisation of enzyme action. **Food Chemistry**, v.109, n.2, p.368-378, 2008.

HENZ, G.P.; REIFSHNEIDER, F.J.B.; SANTOS, F.F. Reação de genótipos de mandioquinha-salsa à podridão-mole das raízes causada por *Pectobacterium chrysanthemi*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.1 p 95-98, 2005.

HEPLER P.K., Calcium: a central regulator of plant growth and development. **Plant Cell**. V.17, p.2142-2155, 2005.

HOPKINS, W.G.E HUNER, N.P.A. **Introduction to Plant Physiology**. 3ed, 2009. 528p.

JABUONSKI, R.E.; TAKATSU, A.; REIFSCHNEIDER, F.J B. Levantamento e identificação de espécies de *Erwinia* de diferentes plantas hospedeiras e regiões do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, n.1, p.185-195, 1986.

JARVIS, M.C.; BRIGGS, S.P.H.; KNOX, J.P. Intercellular adhesion and cell separation in plants. **Plant, Cell and Environment**, v.26, n.7, p.977-989, 2003.

JOLIE, R.P.; DUVETTER, T.; VAN LOEY, A.M.; HENDRICKX, M. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor. **Carbohydrate Research**, v.345, n.18, p.2583-2595, 2010.

KIKUMOTO, T. Ecological aspects of soft rot bacteria. **Report of the Institute for Agricultural Research**, v.31, 19-41. 1980.

KLAUS, B. Cálcio nos solos e nas plantas. Reserarch Centre Hanninghof. **Informações agrônômicas**, n. 117, 2007.

LEMOS, O.L. **Utilização de biofilmes comestíveis na conservação pós-colheita do pimentão 'Magali R'**. 2006. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista- BA, 2006.

LEVY, I.; SHANI, Z.; SHOSEYOV, O. Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4- β -glucanase and cellulose-binding domains. **Biomolecular engineering**, v.19, n.1, p.17-30. 2002.

LIU, R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, n.3, p.517S-520, 2003.

LUNA-GUZMÁN, I.; BARRET, D.M. Comparison of Ca chloride and Ca lactate effectiveness in maintaining shelf stability and quality of fresh-cut cantaloupes. **Postharvest Biology and Technology**, v.19, n.1, p.61-72, 2000.

MANGANARIS, G.A.; VASILAKAKIS, M.; DIAMANTIDIS, G.; MIGNANI, I. The effect of postharvest calcium application on tissue calcium concentration, quality attributes, incidence of flesh browning and cell wall physicochemical aspects of peach fruit. **Food Chemistry**, V.100, n.4, p.1385–1392, 2007.

MARAME, F.; FININSA, C.; SINGH, H.; DESSALEGNE, L.; ANDERSSON, A.; SIGVALD, R. Occurrence of aphid vector and genetic tolerance to infection by potyvirus in hot pepper. **Euphytica**, v.172, n.1, p.77-91, 2010.

MARI, M.; GUIZZARDI, M. The postharvest phase: emerging technologies for the control of fungal diseases. **Phytoparasitica**, v. 26, n. 1, p. 59-66, 1998.

MEDINA, P.U.L. Manejo pós-colheita de pimentões e pimentas. **Informe agropecuário**, v.10 n.113, p.72-76, 1984.

MOLINA-HIDALGO, F.J.; FRANCO, A.R.; VILLATORO, C.; MEDINA-PUCHE, L.; MERCADO, J.A.; HIDALGO, M.A.; BLANCO-PORTALES, R. The strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit-specific rhamnogalacturonate lyase 1 (FaRGLyase1) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell-wall middle lamellae. **Journal of experimental botany**, v.64, n.6, p.1471-1483, 2013.

MONGKOLPORN R.; TAYLOR, O.P.M.J. **Capsicum**. In: Kole, C. (ed.) Wild crop relatives: genomic and breeding resources vegetables. Berlin: Springer-Verlag, p. 43-57, 2011.

MOREIRA, S.O. **Caracterização morfológica e molecular de pré-cultivares de *Capsicum annum* L. com resistência a mancha-bacteriana**. 2012. Tese (Doutorado em genética e melhoramento de plantas)-Univerisade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes- RJ, 2012.

MOTA, W.F.; SALOMÃO, L.C.C; PEREIRA, M.C.T.P; CECON,P.R. Influência do tratamento pós-colheita com cálcio na conservação de jabuticabas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24,n.1, p.49-52, 2002.

NGADZE, E.; COUTINHO, T.A.; ICISHAHAYO, D.; VAN DER WAALS, J.E. Effect of calcium soil amendments on phenolic compounds and softrot resistance in potato tubers. **Crop Protection**, v. 62, p.40-45, 2014.

NGUYEN, B. Ly.; VAN LOEY, A.D.; VERLENT, I.; HENDRICKX, I.M. Purification, characterization, thermal, and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from bananas (cv Cavendish). **Biotechnology and Bioengineering**, v.78, p.683-691, 2002.

NUNES, C.S.; CASTRO, S.M.; SARAIVA, J. A.; COIMBRA, M. A. M.; VAN LOEY. A.; HENDRICKX, M. Thermal and high-pressure stability of purified pectin methylesterase from plums (*Prunus domestica*). **Journal of Food Biochemistry**, v.30, n.2, p.138-154, 2006.

O'DONOVAN, A.; GUPTA, V.K.; COYNE, J.M.; TUOHY, M.G. Acid Pre-treatment Technologies and SEM Analysis of Treated Grass Biomass in Biofuel Processing. In Biofuel Technologies: **Springer Berlin Heidelberg**, p.97-118, 2013.

OLIVEIRA, L.F.M. **Controle alternativo da antracnose durante a pós-colheita de goiabas 'paluma' simulando armazenamento e a comercialização**. 2012. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Sergipe, 2012.

PAIVA, E.P.; LIMA, M.S.; PAIXÃO, J.A. Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.10, n.4, p.196-211, 2009.

PÉROMBELON, M.C.M.; VAN DER WOLF, J.M. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual. 2. ed. Invergowrie. **Scottish Crop Research Institute**. 2002. 82p.

PIRHONEN, M.; SAARILAHTI, H.; KARLSSON, M.B.; PALVA, E.T. Identification of pathogenicity determinants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by transposons mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interact**, v.4, n.3, p. 276-283, 1991.

PLAZA L.; DUVETTER T.; PLANCKEN I. V.D.; MEERSMAN F.; VAN LOEY A.; HENDRICKX M. Influence of environmental conditions on thermal stability of recombinant *Aspergillus aculeatus* pectin methylesterase. **Food Chemistry**, v.111, n.4, p.912-920, 2008.

QUILES, A.; HERNANDO, I.; PÉREZ-MUNUERA, I.; LLUCH, M.A. Effect of calcium propionate on the microstructure and pectin methylesterase activity in the parenchyma of fresh-cut Fuji apples. **Journal Science Food and Agriculture**, v 87, n.3, p. 511–519, 2007.

RESENDE, J.M.; CHITARRA, M.I.F.; MALUF, W.R.; CHITARRA, A.B.; SAGGIN JÚNIOR, O.J. Atividade de enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase durante o amadurecimento de tomates do grupo multilocular. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.2, p.206-212, 2004.

ROCHA, M.C.; CARMO, M.G.F.; POLIDORO, J.C.; SILVA, D.A.G.; FERNANDES, M.C.A. Características de frutos de pimentão pulverizados com produtos de ação bactericida. **Horticultura Brasileira**, v.24, n.2, p.185-189, 2006.

SALMOND, G.P.C. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Ann. Revista Phytopathologi*, v. 32, p. 181-200, 1994.

SETHU, K.M. P.; PRABHA, N.T.; THARANATHAN, R.N. Post-harvest biochemical changes associated with the softening phenomenon in *capsicum annum* fruits. **Phytochemistry**, v.42, n.4, p.961-966, 1996.

SILA, D.N.; SMOUT, C.; SATARA, Y.; TRUONG, V.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX, M. Combined thermal and high pressure effect on carrot pectin methylesterase stability and catalytic activity. **Journal of Food Engineering**, v.78, n.3, p.755-764, 2007.

SILVA, M.A.; CARVALHO, F.C.Q.; SILVA, J.R.; LINS, S.R. de O.; OLIVEIRA, S.M.A. Uso de antagonistas e produtos alternativos no manejo pós-colheita de podridão mole em pimentão. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 4, p. 718-725, 2014.

SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R.L.R. **Isolamento de bactérias fitopatogênicas**. In: MARIANO, R. L.R.; SILVEIRA, E. B. (Coords.) Manual de práticas em Fitobacteriologia. 2.ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. 23-34p.

SUUTARINEN, J.; HONKAPÄÄ, K.; HEINIÖ, R.L.; AUTIO, K.; MUSTRANTA, A.; KAPPINEN, S. Effects of calcium chloride-based prefreezing treatments on the quality factors of strawberry jams. **Journal of Food Science**, v.67, n.2, p.884–894, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Sinauer, Assoc. Inc. Sunderland Ma, USA, 5 ed. 2009. 782p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

VALERO, D.; SERRANO, M. **Postharvest biology and technology** for preserving fruit quality, Vol.1, New York: CRS press. 2010.

VAN BUGGENHOUT, S.; SILA, D.N.; VAN LOEY, T.A.; HENDRICKX, M. Pectins in Processed Fruits and Vegetables: Part III—Texture Engineering. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.8, n.2, p.105-117, 2009.

VILAS BOAS, B.M.; ALVES, A.D.P.; ALVES, J.A.; RODRIGUES, L.J.; ALVES, T.C.; VILA BOAS, E.V.D.B. Physical, chemical and biochemical characterization of pequi fruit harvested at different stages of development. **Ciência Rural**, v.43, n.12, p.2285-2290, 2013.

WHITE, P.J.; BROADLEY, M.R. Calcium in plants. **Annals of Botany**, v.92, n.4, p. 487–511, 2003.

WIERZBICKI, R. **Identificação de raças de *Xanthomonas* spp. patogênicas a pimentão no estado de São Paulo**. 2004, 76p. Dissertação (Mestrado)- Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP, 2004.

WILLATS, W.G.; MCCARTNEY, L.; MACKIE, W.; KNOX, J. P. Pectin: Cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, v.47, p.9-27, 2001.

YAMAMOTO, E.L.M.; FERREIRA, R.M.A.; FERNANDES, P.L.O.; ALBUQUERQUE, L. B.; ALVES, E.O. Função do cálcio na degradação da parede celular vegetal de frutos. **Revista Verde**, v.6, n.2, p. 49 – 55, 2011.

5. ARTIGO 1: AÇÃO DA PECTINA METIL ESTERASE E CLORETO DE CÁLCIO NO CONTOLE DA FIRMEZA DO PIMENTÃO

Periódico a ser submetido: Pesquisa Agropecuária Brasileira

RESUMO

Resumo - O objetivo do trabalho foi promover a manutenção da firmeza em pimentão aplicando pectina metil esterase associada a cloreto de cálcio. Os frutos foram submetidos à infusão a vácuo com água, infusão a vácuo com cloreto de cálcio a 7% e infusão a vácuo de PME associado ao cloreto de cálcio a 7%, além dos frutos sem infusão. Avaliou-se a perda de massa fresca, firmeza do fruto, cor da casca, teor de sólidos solúveis, pH, acidez total e atividade de PME. Em relação à perda de massa fresca houve um aumento significativo ao longo do tempo em todos os tratamentos. Os resultados indicaram que os tratamentos Ca e SI como os mais adequados para manutenção da firmeza, pois apresentaram as menores variações da atividade da PME, que resultou nas menores perdas de firmeza e concentrações de ácidos orgânicos. Sendo a infusão a vácuo com cloreto de cálcio a 7% capaz de manter a firmeza e as características físico-químicas aceitáveis do pimentão cv. Yolo Wander, muito embora o pimentão não seja um fruto recomendado para se aplicar a técnica de infusão a vácuo. Resultando que a aplicação de PME+CaCl₂ não promoveu a manutenção das características de firmeza desejável para o pimentão.

Termos de indexação: *Capsicum annuum* L., enzima PME, cálcio, pós-colheita.

ABSTRACT

Título: Pectin methyl esterase action and calcium chloride in the pepper control firmly

The objective was to promote the maintenance of firmness in applying pepper pectin methyl esterase associated with calcium chloride. The fruits were subjected to vacuum infusion with water, vacuum infusion with calcium chloride 7% and vacuum infusion pectin methyl esterase associated with calcium chloride 7%, besides the fruit without infusion. It evaluated the loss of weight, fruit firmness, skin color, soluble solids, pH, total acidity and activity of pectin methyl esterase. Regarding fresh weight loss was a significant increase over time in all treatments. The results indicated that Ca and SI treatments as the most suitable for firmness maintenance, as presented the smallest variations in the activity of pectin methyl esterase, which resulted in lower losses of firmness and organic acid concentrations. As the vacuum infusion with calcium chloride 7% able to maintain firmness and acceptable physical-chemical characteristics of the pepper cv. Yolo Wander, although the pepper fruit is not recommended to apply vacuum infusion technique. Resulting in the application of PME + CaCl_2 did not promote the maintenance of firmness characteristics desirable for pepper.

Index terms: *Capsicum annuum* L., enzyme PME, calcium, Postharvest.

5.1. Introdução

O pimentão (*Capsicum annum* L.) é uma importante cultura agrícola, por possuir um rico conteúdo de micronutrientes e antioxidantes que compõe um alto valor nutricional, como vitamina C e A, elevando assim a sua importância econômica, porém existem algumas limitações na pós-colheita desse fruto (Sethu et al., 1996) como a perda de firmeza e o curto período de vida-útil (Ghasemnezhad et al., 2010).

Durante a pós-colheita do pimentão, ocorrem alterações na parede celular causando amolecimento excessivo devido ao afrouxamento da parede celular que envolve a degradação da pectina e dos componentes da hemicelulose, durante esse amolecimento há um aumento da pectina solúvel e uma diminuição da pectina insolúvel, ocasionando uma redução da firmeza (Song et al., 2016).

A firmeza do pimentão depende da integridade estrutural da parede celular e da lamela média. Enzimas como pectina metil esterase (PME) (EC 3.1.1.11) e poligalacturonase (PG) (EC 3.2.1.15) estão envolvidas na degradação da pectina e outros materiais de parede celular (Jolie et al., 2010), resultando em um fruto com firmeza reduzida e perda de qualidade sensorial.

No entanto a PME quando aplicada exogenamente e associado ao cálcio, ela interage sucessivamente com o cálcio, formando os pectatos de cálcio e ocasiona uma redução na degradação da parede celular do fruto (Martín-Diana et al., 2006; Degraeve et al., 2003). Essa enzima catalisa a hidrólise de metil ester liberando metanol e os ácidos carboxílicos livres na pectina, onde há presença de íons divalentes, como o cálcio, onde o grupo de ácidos carboxílicos livres em diferentes cadeias de pectina pode ser retido resultando em uma rede de cadeias de pectina e formação de gel promovendo uma melhor firmeza dos vegetais (Duvetter

et al., 2005). Fazendo com que tal associação (pectinametilesterase exógena com o cálcio) permita manter a firmeza no fruto (Galleto et al., 2010).

O uso de sais de cálcio por infusão a vácuo ou por imersão associado ou não a PME exógena foram estudados em tomates (Gomes et al., 2005), morangos (Fraeye et al., 2009), manga (Taain et al., 2011) e goiaba (Werner et al., 2009) e demonstraram efeito positivo, tornando-os mais firmes durante o armazenamento (Sutarinen et al., 1999; Luna-Guzman et al., 2000).

Diante do exposto o objetivo do trabalho foi promover a manutenção da firmeza em pimentão aplicando pectinametilesterase (PME) associada a cloreto de cálcio.

5.2. Material e Métodos

Os pimentões da variedade Yolo Wander (Cv.) foram adquiridos da região de Itabaiana/SE, Brasil, no estágio de maturação completamente verde, com peso médio de 220 g e comprimento médio de 9 a 10 cm. Foram colhidos de acordo com sua aparência, cor e tamanho e posteriormente transportado para o laboratório de Ecofisiologia e Pós-colheita (ECOPOC) do departamento de Agronomia da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão/SE.

Foram lavados em água corrente por 1 min, seguido de lavagem em água destilada. Em seguida foram mantidos em bancadas para a secagem com auxílio de papel toalha e montagem do experimento.

Os pimentões foram submetidos à infusão a vácuo em um dessecador com manômetro acoplado a uma bomba a vácuo (modelo 8300; Diagtech). O fruto inteiro foi imerso em um *Becker* de vidro de 600 ml com 375 ml de solução aquosa. Foi utilizado uma pressão de 200 mmHg por 5 minutos de modo que não houvesse mais saída de bolhas de ar, tanto da solução quanto do fruto. Os tratamentos foram os frutos em infusão com H₂O destilada (CI), frutos em infusão com cloreto de cálcio (CaCl₂, 7%) e infusão com PME+Cloreto de cálcio (CaCl₂, 7%). A concentração de 7% de cloreto de cálcio foi determinada por pré-testes em pimentões. O controle foi utilizado frutos sem infusão.

A enzima pectina metilesterase (PME) utilizada foi a comercial (Novoshape), com atividade declarada de 10 PEU/mL, fabricada pela Novozymes, Denmark. É uma enzima derivada do gene de codificação a partir do fungo *Aspergillus aculeatus* (E.C.3.1.1.11). A concentração utilizada foi 1mL/kg de fruta.

Após o preparo, os frutos foram mantidos em bancadas para secagem e por seguinte acondicionados em câmaras B.O.D com controle de temperatura (20°C ± 1°C) e umidade relativa (75% ± 5%).

A perda de massa fresca (PMF) dos frutos foi obtida a partir da pesagem frutos desde a colheita até o último dia de armazenamento. Os frutos foram pesados em balança semianalítica modelo (modelo BG 8000 Max; GEHAKA) sendo os resultados expressos em porcentagem de massa fresca perdida.

A cor da casca (CC) foi determinada com o colorímetro, (modelo CR-400; Konica Minolta), de acordo com a escala L* a* b* ângulo de cor (°h), a cromaticidade (C) e o brilho (L). Em relação à cor da casca, duas leituras por fruto, em lados opostos da sua região mediana.

Para a determinação da firmeza (FF) utilizou-se o penetrômetro digital (modelo TR; Turoni), com ponteira de 8 mm de diâmetro. Foi realizada a medição com duas leituras em cada fruto inteiro, na região mediana e em dois lados opostos do mesmo. Os resultados obtidos foram expressos em Newton (N).

A análise de sólidos solúveis (SS) foi realizada por meio de leitura refratométrica direta em graus (°Brix), em duas amostras em cada fruto, com o refratômetro de banca digital (modelo RTD-45, Instrutherm), de acordo com os procedimentos descrito por El-Bulk et al.,

1997.

Para a obtenção do pH Foram coletados 5 g do pimentão, as quais foram maceradas e homogeneizadas com 50 mL de água destilada. O pH foi medido utilizando-se um pHmetro de bancada (modelo, PHS-3E, LabMeter), segundo técnica descrita pela AOAC (1995).

A acidez total (AT) foi determinada de acordo com AOAC (1995), em que 5,0 ml do suco da polpa foram homogeneizadas em 50 ml de água destilada. À amostra foram adicionadas três gotas do indicador fenolftaleína a 1%, procedendo-se em seguida a titulação, sob agitação, com solução de NaOH 0,01 N, com resultados expressos em porcentagem de ácido cítrico.

Para a análise de atividade de pectina metil esterase (PME) foram homogeneizada 25 g da polpa com 50 ml de NaCl 0,2 N o homogenato foi filtrado em gaze, o pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 0,1 N e o novo homogenato incubado a 4°C por 1 hora em agitação. O material foi centrifugado a 25.000 g, por 15 minutos, a 4°C. Para determinação da atividade utilizou-se uma alíquota de 6 ml de extrato e a ela adicionou 30 ml de pectina cítrica a 1% em NaCl 0,2 N pH 7,0. A taxa de desmetilação do extrato foi medida por titulação com NaOH 0,01 N, mantendo-se o pH em 7,0 por 10 minutos. Uma unidade de atividade enzimática (UAE) de pectina metilesterase foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a desmetilação de pectina correspondente ao consumo de 1 nmol de NaOH por 10 minutos. Os resultados foram expressos em UAE por grama da massa fresca por minuto (Jen e Robinson, 1984).

Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4x5, sendo quatro formas de aplicação (sem infusão (SI), com infusão em água (I), infusão com cloreto de cálcio (Ca) e infusão PME associado ao cloreto de cálcio (PME+Ca)) e cinco períodos de avaliação (0, 3, 6, 9, 12 dias após a aplicação dos tratamentos), com três repetições de cada tratamento, totalizando 60 frutos. Os dados foram submetidos à análise da variância ($p \leq 0,05$) e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Utilizando-se para tanto o programa estatístico SISVAR.

5.3. Resultados e Discussão

Verificou-se que a porcentagem da perda de massa foi aumentando significativamente ao longo do tempo para todos os tratamentos, isso foi devido à perda de água decorrente da transpiração dos frutos, o que levou ao amolecimento durante o armazenamento (Khaliq et al., 2015). Também foi verificado em pimentões verdes o aumento na perda de massa ao longo do período de armazenamento por Lima et al. (2014) e Hojo et al. (2007), tal, perda chegou a 16,09% com oito dias de armazenamento (Hojo et al., 2007).

Durante os seis primeiros dias de armazenamento todos os tratamentos não diferiram entre si, apresentando perda de massa entorno de 13%. No nono dia as perdas foram mais expressivas, com menores valores para SI 29,48% e os demais tratamentos Ca, PME+Ca e I com 53, 50 e 61% respectivamente e não diferiram estatisticamente. Provavelmente a maior perda de massa fresca em pimentões onde houveram infusão tenha ocorrido em função do pimentão ser um fruto oco e de espessura fina, o que promoveu alterações celulares indesejáveis, pois o mesmo tem capacidade limitada de armazenar água (Maalekuu et al., 2003).

A firmeza foi drasticamente reduzida ao longo do tempo para todos os tratamentos, com menor intensidade para os frutos com aplicação de cálcio e sem infusão, pois com o amadurecimento ocorre naturalmente a maior flexibilização da parede celular, que pode ser reduzida com a adição de cálcio (Maalekuu et al., 2003).

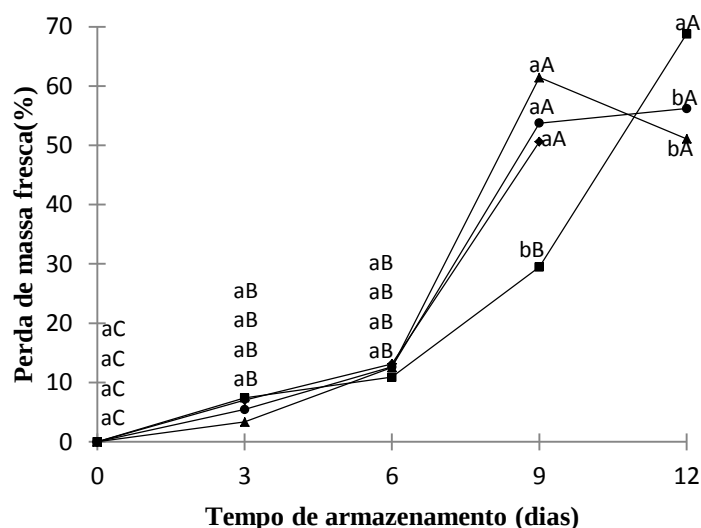


Figura 5.1. Porcentagem de perda de massa fresca em pimentões submetidos aos tratamentos ■ – Sem infusão (SI), ◆ - infusão em água (I), ● - infusão em cloreto de cálcio (Ca) e ▲ - infusão em PME+CaCl₂ (PME+Ca) armazenados ao longo de doze dias a 20°C ± 1°C em B.O.D. As médias seguidas pela mesma letra minúscula no tratamento e maiúscula no período de armazenamento não diferem significativamente entre si pelo teste de tukey $p \leq 0,05$.

A menor perda de firmeza do tratamento Ca em relação aos outros tratamentos foi de apenas 11,5% até o nono dia devido à atuação do cloreto de cálcio na regulação do amolecimento do fruto formando pontes entre os ácidos pécticos e polissacarídeos, ou seja, sua complexação a parede celular e lamela média de resíduos de ácidos galacturônicos atribuindo uma melhora na integridade estrutural do fruto (Mota et al., 2002). Da mesma forma, Chen et al. (2011) verificaram uma constante firmeza até o décimo dia de armazenamento para os morangos tratados com cloreto de cálcio a 4% e Suutarinen et al. (2002) não verificaram diferença entre morangos com infusão de CaCl₂ e o controle sem infusão.

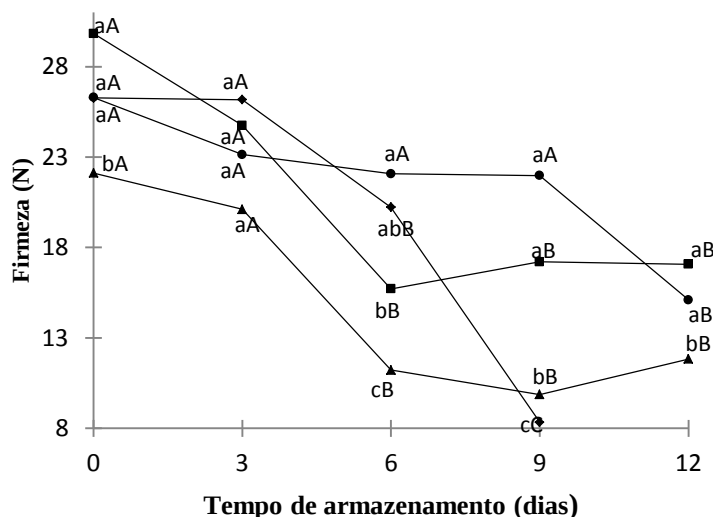


Figura 5.2. Firmeza em pimentões submetidos aos tratamentos ■ – Sem infusão (SI), ◆ - infusão em água (I), ● - infusão em cloreto de cálcio (Ca) e ▲ - infusão em PME+CaCl₂ (PME+Ca) armazenados ao longo de doze dias a 20°C ± 1°C em B.O.D. As médias seguidas pela mesma letra minúscula no tratamento e maiúscula no período de armazenamento não diferem significativamente entre si pelo teste de tukey $p \leq 0,05$.

A adição da PME exógena associado ao cálcio não contribuiu para uma manutenção da firmeza no pimentão apresentando perda na ordem de 58% até o nono dia, fato também observado por Galletto et al. (2010) que verificaram em morangos imersos em cloreto de cálcio+PME a não eficiência da manutenção da firmeza em comparação ao tratamento sem a imersão ao longo do tempo. Provavelmente a infusão a vácuo causou perda da integridade do tecido que foi compensado pelo soluto ativo infundido (Saurel, 2002), neste caso o cálcio foi o agente cimentante e não a associação com a PME exógena.

Para a maioria dos frutos o amadurecimento envolve a mudança da coloração que muitas vezes vai do verde quando imaturo para outra cor quando maduro, pois esta mudança está relacionada ao conteúdo de pigmentos totais como clorofilas *a*, *b* e carotenoides, sendo estes pigmentos degradados ou sintetizados durante o processo de amadurecimento (Bohn e Walczyk, 2004). Neste trabalho os pimentões também não apresentaram alteração na cor, mantiveram-se verde ao longo de todo armazenamento, sendo esta uma característica intrínseca deste fruto. Verificou-se também que não houve variação dos valores entre os tratamentos em relação ao ângulo de *hue* (*h*) exceto uma queda no terceiro dia no tratamento com cloreto de cálcio onde obteve um valor de 89,86°. A luminosidade (*L*) não apresentou diferenças entre os tratamentos, não alterando o brilho do fruto. Para a intensidade da cor (*C*) o tratamento PME+Ca no primeiro dia teve uma maior intensidade de cor, enquanto que no terceiro dia o tratamento sem infusão foi o que obteve uma maior intensidade. Resultados semelhantes foram encontrados por Mahmud et al. (2008), onde demonstraram que a aplicação de soluções de CaCl_2 a vácuo em mamão promoveu a manutenção da cor verde da casca do fruto durante 21 dias de armazenamento.

Os tratamentos SI e Ca foram os que apresentaram as menores variações quanto ao teor de sólidos solúveis, sendo que o SI não diferiu estatística ao longo do tempo com valores médios 4,6 °Brix (Tabela 1). Enquanto que o tratamento com cálcio o valor médio foi de 4,30 °Brix com pequenas variações, ou seja, um pequeno efeito sobre o teor de sólidos solúveis, assim como verificado por Wickramasinghe et al. (2013) que verificaram em tomates tratados com cálcio onde teve um pequeno efeito no teor de sólidos solúveis. Nos demais tratamentos, observaram-se tendências diferentes, o tratamento I apresentou incremento do sexto para o nono dia passando de 3,10 para 5,03 °Brix, momento em que foi descartado por não estar apto para o consumo e também relacionado ao aumento da perda de massa fresca (Figura 1) levando ao maior acúmulo de sólidos solúveis.

Enquanto que o tratamento PME+Ca apresentou pico de 6,00°Brix no terceiro dia e reduzindo a 2,53 °Brix no último dia, provavelmente essa variação esteja relacionada à PME e senescência do fruto, pois segundo Ghasemnezhad et al. (2011) a enzima PME pode resultar no incremento de SS no fruto devido a degradação ou biossíntese de polissacarídeos, a acumulação de açúcares e a redução em função do aumento da taxa respiratória, promovendo maior degradação de teores de SS, reduzindo-o com o tempo (Yaman e Bayoindirli, 2002). Também foi verificado por Vicentini (1999) em que os pimentões apresentaram um aumento de sólidos solúveis até o sexto dia, seguido de uma diminuição para os dias seguintes.

Todos os tratamentos (SI, I, Ca, PME+Ca) apresentaram incremento na AT no sexto dia com decréscimo após essa data (Tabela 2). O aumento na concentração da acidez está relacionado à perda de firmeza (Figura 2), pois a firmeza é regida pela turgidez da célula e a integridade da pectina, principal componente da parede celular (Taiz e Zeiger, 2015). Ao longo do armazenamento os pimentões apresentaram grande perda de massa fresca a partir do sexto dia (Figura 1), reduzindo a turgidez da parede celular e a perda de firmeza que pode ser observada na figura 2 mais acentuada ao sexto dia que ocasionou incremento na AT, pois com a perda de firmeza ocorre a degradação da pectina e o produto final dessa ação são os ácidos orgânicos (Ghasemnezhad et al., 2011). Silva et al. (2011) também relataram o aumento na acidez total e pimentões com o tempo devido a o aumento na formação de ácidos orgânicos.

O pH manteve-se constante ao longo do tempo para todos os tratamentos e praticamente não diferiu entre os tratamentos. Comportamento semelhante foi observado por

Chitravathi et al. (2014), que também constataram pouca variação do pH de pimentões armazenados a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 12 dias. O pH da solução variou de 5,81 a 6,73 demonstrados na (Tabela 2), situando-se na faixa de frutos não ácidos, conforme estabelecido por Gould (1974) que afirma que o pH do pimentão atinge 6,52 no fruto verde imaturo e depois tende a diminuir com o amadurecimento, chegando a 5,02 no fruto maduro como constatado neste trabalho.

A atividade da PME tende na maioria dos casos a aumentar durante o amadurecimento e ao longo do tempo (Figura 3), pois está relacionado à degradação da parede celular. Tanto em pêssegos como em alface também foram verificados incremento da atividade ao longo do tempo (Martín-Diana et al., 2006; Manganaris et al., 2007).

Os frutos que não foram submetidos à infusão, a atividade da PME foi menos acentuada apresentando incremento somente no termino do armazenamento (Figura 3). Enquanto que os frutos submetidos à infusão apresentaram níveis mais altos da atividade da PME. Foi verificado no tratamento PME+Ca os níveis mais elevados em função da atividade da PME exógena se somar a endógena, aumentando a concentração interna e promovendo a desmetilação e complexação do Ca^{2+} , devido processo de amolecimento dos frutos e consequente aumento ao longo do tempo (Oliveira Júnior et al., 2004). A maior atividade da PME refletiu diretamente na maior perda de firmeza (Figura 2), pois a solubilização da pectina é devido ao aumento da atividade da pectina metil esterase (EC 3.1.1.11) sendo responsável pelo amolecimento e associado ao amadurecimento (Sethu et al., 1996).

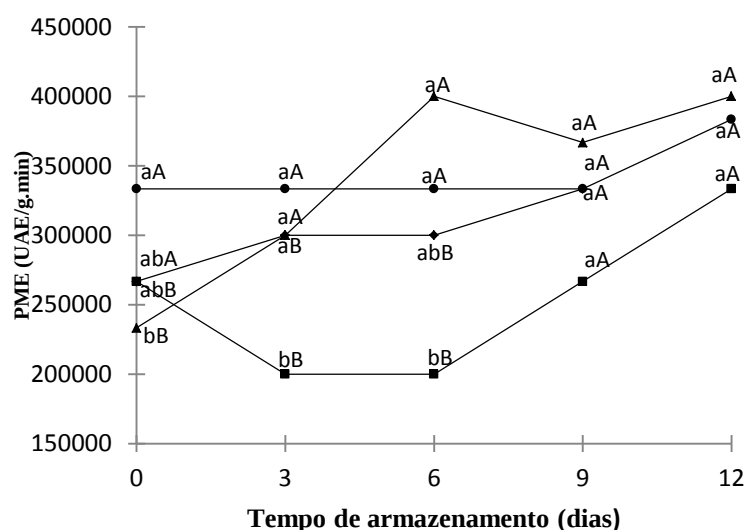


Figura 5.3. Atividade de pectina metil esterase (ATPME) pimentões submetidos aos tratamentos ■ – Sem infusão (SI), ◆ - infusão em água (I), ● - infusão em cloreto de cálcio (Ca) e ▲- infusão em PME+CaCl₂ (PME+Ca) armazenados ao longo de doze dias a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em B.O.D. As médias seguidas pela mesma letra minúscula no tratamento e maiúscula no período de armazenamento não diferem significativamente entre si pelo teste de tukey $p \leq 0,05$.

No caso da infusão com água o incremento da atividade da PME foi verificado mais acentuado a partir do sexto dia de armazenamento, coincidindo com a perda de firmeza (Figura 2) e com o incremento da acidez total (Tabela 2). Pois com a atividade da PME ocorre a degradação da pectina e resulta na produção de ácidos orgânicos, este comportamento pode ser devido às alterações na solubilidade da enzima durante o armazenamento (Martín-Diana et al., 2006).

O cálcio aplicado aos frutos proporcionou uma estabilização na atividade da PME fazendo com que ela não variasse estatisticamente ao longo do tempo em função da formação

de pectato de Ca, composto que diminui a ação dessa enzima, proporcionando maior rigidez da lamela média e da parede celular (Luna-guzman et al., 2000; Xisto et al., 2004).

O tratamento Ca e SI foram os mais adequados para manutenção da firmeza, pois apresentaram as menores variações da atividade da PME, que resultou nas menores perdas de firmeza e concentrações de ácidos orgânicos provenientes da solubilização da pectina, responsável pela perda de firmeza.

5.4. Conclusões

O pimentão não é um fruto recomendado para se aplicar a técnica de infusão a vácuo.

A aplicação de PME+CaCl₂ não promove a manutenção das características de firmeza desejável para o pimentão.

A infusão a vácuo com cloreto de cálcio a 7% em pimentão mantém a firmeza e as características físico-químicas aceitáveis do pimentão cv. Yolo Wander.

5.5. Referências Bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC International. **Food Composition, Additives, Natural Contaminants. S.L. AOAC International.** v.37, p.1-23, 1995.

BOHN, T.; WALCZYK, T. Determination of chlorophyll in plant samples by liquid chromatography using zinc-phthalocyanine as an internal standard. **Journal of chromatography**, v.1024, p.123-128, 2004.

CHEN, F.; LIU, H.; YANG, H.; LAI, S.; CHENG, X.; XIN Y.; HOU, B.Y.H; YONGZHI YAO, Y.; ZHANG, S.; BU, G.; DENG, Y. Quality attributes and cell wall properties of strawberries (*Fragaria annanassa* Duch) under calcium chloride treatment. **Food Chemistry**, v.126, p.450–459, 2011.

CHITRAVATHI K.; CHAUHAN O.P.; RAJU P.S. Postharvest shelf-life extension of green chillies (*Capsicum annuum* L.) using shellac-based edible surface coatings. **Postharvest Biology and Technology**, v.92, p.146–148, 2014.

DEGRAEVE, P.; SAUREL, R.; COUTEL, Y. Vacuum impregnation pretreatment with pectin methylesterase to improve firmness of pasteurized fruits. **Journal of Food Science**, v.68, p.716–721, 2003.

DURVETTER, T.; FRAEYE, I.; VAN HOANG, T.; VAN BUGGENHOUT, S.; VERLENT, I.; SMOUT, C. Effect of pectin methylesterase infusion methods and processing techniques on strawberry firmness. **Journal of Food Science**, v.70, p.383–388, 2005.

EL-BULK, R. E.; BABIKER, EL-F. E.; EL-TINAY, A.H. Changes in chemical composition of guava fruits during development and ripening. **Food Chemistry**, v.59, p.395-399, 1997.

FRAEYE, I.; KNOCKAERT, G.; VAN BUGGENHOUT, S.; DUVETTER, T.; HENDRICKX, M.; VAN LOEY, A. Enzyme infusion and thermal processing of strawberries: Pectin conversions related to firmness evolution. **Food Chemistry**, v.114, p.1371–1379, 2009.

GALETTTO, C.D.; ROXANA, A.; VERDINI, R.A.; SUSANA, E.Z.; RUBIOLO, A.C. Freezing of strawberries by immersion in CaCl_2 solutions. **Food Chemistry**, v.123, p.243–248, 2010.

GHASEMNEZHAD, M.; SHERAFATI, M.; ALI, PAYVAST G. Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of five coloured bell pepper (*Capsicum annum*) fruits at two different harvest times. **Journal of functional foods**, v.3, p.44 – 49, 2011.

GOMES, A.M.A.; SILVEIRA, E.B.; MARIANO, R.L.R. Tratamento pós-colheita com cálcio e microrganismos para controle da podridão-mole em tomate. **Horticultura Brasileira**, v.23, p.108-111, 2005.

GOULD, W.A. **Tomato production, processing and quality evaluation**. 1 ed. Westport: The AVI. 1974.

HOJO, E.T.D.; CARDOSO, A.D.; HOJO, R.H.; VILAS BOAS, E.V.B.; ALVARENGA, M.A.R. Use cassava starch films and pvc on post-harvest conservation of bell pepper. **Ciênc. Agrotec**, v.31, p.184-190, 2007.

JEN, J. J.; ROBINSON, M. L. P. Pectolytic enzymes in sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Food Science**, v.49, p.1045-1087, 1984.

JOLIE, R.P.; DUVETTER, T.; VAN LOEY, A.M.; HENDRICKX, M. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review, **Carbohydrate Research**, v.345, p.2583-2595, 2010.

KHALIQ, G.; MOHAMEDA, M.T.M.; ALI A., DINGA P.; GHAZALI H.M. Effect of gum arabic coating combined with calcium chloride on physico-chemical and qualitative properties of mango (*Mangifera indica* L.) fruit during low temperature storage. **Scientia Horticulturae**, v.190, p.187–194, 2015.

LEMOES, O.L.; REBOUÇAS, T.N.H.; SÃO JOSÉ, R.; VILA M.T.R.; SILVA, K.S. Utilização de biofilme comestível na conservação de pimentão ‘magali r’ em duas condições de armazenamento. **Braganti**, v.66, p.693-699, 2007.

LIMA, G.S. SANTOS, M.J.P.; ANDRADE, R.O.; SILVA J.G.; SOUZA, S. Conservation green chili stored post-harvest in temperature and under refrigeration. **Revista Verde**, v.9, p.51 – 53, 2014.

LUNA-GUZMAN, I.; CANTWELL, M.; BARRET, D.M. Fresh-cut cantaloupe: effects of CaCl_2 dips and heat treatments on firmness and metabolic activity. **Postharvest Biology and Technology**, v.17, p.201–213, 2000.

MAALEKUU, K.; ELKIND, Y.; TUVIA-ALKALAI, S.; SHALOM, Y.; FALLIK, E. 2003. Quality evaluation of three sweet pepper cultivars after prolonged storage. **Adv Hort Sci**, v.17, p.187–191, 2003.

MAHMUD, T.M.M.; SYED OMAR, S.R.; MOHAMED ZAKI, A.R.; AL-ERYANI, A.R. Effects of calcium and chitosan treatments on controlling anthracnose and postharvest quality of papaya (*Carica papaya* L.). **International Journal of Agricultural Research**, v.4, p.53-68, 2008.

MANGANARIS, G.A.; VASILAKAKIS, M.; DIAMANTIDIS, G.; MIGNANI, I. The effect of postharvest calcium application on tissue calcium concentration, quality attributes, incidence of flesh browning and cell wall physicochemical aspects of peach fruits. **Food Chemistry**, v.100, p.1385-1392, 2007.

MARTÍN-DIANA, A.B.; RICO, D.; FRÍAS, J.; HENEHAN, G.T.M.; MULCAHY, J.; BARAT J.M. Effect of calcium lactate and heat-shock on texture in fresh-cut lettuce during storage. **Journal of Food Engineering**. 77, 1069–1077, 2006.

MOLINARI, A.F.; CASTRO, L. R.; ANTONIALI, S.; PORNCHALOEMPONG, P.; FOX, A.J.; SARGENT, S.A.; LAMB, E.M. **The potential for bell pepper harvest prior to full color development**. In: Florida state horticultural society. Stuart, Proceedings. Stuart, 1999, p.143-146.

MOTA, W.F. DA; SALOMÃO, L.C.C.; PEREIRA, M.C.T.; CECON, P.R. Influência do tratamento pós-colheita com cálcio na conservação de jabuticabas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.49-052, 2002.

OLIVEIRA JÚNIOR, E. N.; SANTOS, C.D.; ABREU, C.M.P.; CORRÊA, A.D.; SANTOS, J.Z.L. Alterações pós-colheita da fruta-de-lobo (*Solanun lycocarpumk* St. Hill.) durante o amadurecimento: análises físico-químicas, químicas e enzimáticas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, p.410-413, 2004.

RINALDI, M.M.; SANDRI, D.; RIBEIRO M. O.; AMARAL A.G. Características físico-químicas e nutricionais de pimentão produzido em campo e hidroponia. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.558-563, 2008.

SAUREL, R. **The use of vacuum technology to improve processed fruit and vegetables**. In Fruit and vegetable processing: Improving quality, 200, p.363–380.

SETHU, K.M.P.; PRABHA, N.T.; THARANATHAN, R.N. Post-harvest biochemical changes associated with the softening phenomenon in *capsicum annum* fruits. **Phytochemistry**, v.42, p.961-966, 1996.

SILVA, G.; TAKATA, S.E.; ALMEIDA, W.H.B.; VICENTE, G.; EVANGELISTA, R.M.; ELIZABETH, O.O.; DOMINGOS, R. J. Qualidade de frutos de pimentão em função de concentrações de ethephon durante o amadurecimento. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha**, v.12, p.199-205, 2011.

SILVA, W.B. **Efeito do cloreto de cálcio e do uso de cobertura comestível a base de quitosana na conservação pós-colheita do mamão**. 2014, 113p. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ.

SONG, L.; WANG, Z.; WANG, Z.; MENG, G.; ZHAI, R.; CAI, M.; MA, F.; XU, L. Screening of cell wall-related genes that are expressed differentially during ripening of pears with different softening characteristics. **Postharvest Biology and Technology**, v.115, p.1–8, 2016.

SUUTARINEN, J.; ANAKAINEN, L.; AUTIO, K. Comparison of light microscopy and spatially resolved Fourier transform infrared (FT-IR) microscopy in the examination of cell

wall components of strawberries. **Lebensmittel Wissenschaft and Technology**, v.31, p.595–601, 1999.

SUUTARINEN, J.; HONKAPÄÄ, K.; HEINIÖ, R.L.; AUTIO, K.; MUSTRANTA, A.; KAPPINEN, S. Effects of calcium chloride-based prefreezing treatments on the quality factors of strawberry jams. **Journal of Food Science**, v.67, p.884–894, 2002.

TAAIN, D.A.; IBRAHIM, M.A.A.A.H.; AL-SAREH, E.A. A study on the effect of postharvest calcium chloride treatments on the storability of mango fruits (*Mangifera indica* L.). Dirasat: **Agricultural Sciences**, v.37, 2011.

VICENTINI, N.M.; CASTRO, T. M. R.; CEREDA, M.P. Influência da fécula de mandioca na qualidade pós-colheita de frutos de pimentão (*Capsicum annum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n.1, p. 127-130, 1999.

WERNER, E.T.; JUNIOR-OLIVEIRA, L.F.G.DE.; BONA, A.P.D.; CAVATI, B.; GOMES, T.D.U.H. Efeito do cloreto de cálcio na pós-colheita de goiaba ‘Cortibel’. **Bragantia**,v.68, p.511-518, 2009.

WICKRAMASINGHE, W.R.K.D.W.K.V.; ABAYAGUNAWARDANE, W.A.A.S.; DISSANAYAKE, P.K. Effect of pressure infiltration of calcium chloride on postharvest storage life of avocado (*Persia Americana* Mill). **The Journal of Agricultural Sciences**, v.8, p.70, 2013.

XISTO, A.L.R.P.; ABREU, C.M.P.; CORRÊA, A.D.; SANTOS, C.D. Textura de goiabas “Pedro Sato” submetidas à aplicação de cloreto de cálcio. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, p.113-118, 2004.

YAMAN, O.; BAYOINDIRLI, L. Effects of an edible coating and cold storage on shelf-life and quality of cherries. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.35, p.146–150, 2002.

Tabela 5.1. Cor da casca em pimentões submetidos aos tratamentos sem infusão (SI), infusão em água (I), infusão em cloreto de cálcio (Ca) e infusão em pectina metil esterase+CaCl₂ (PME+Ca) armazenados ao longo de doze dias a 20°C ± 1°C em B.O.D. As médias seguidas pela mesma letra minúscula no tratamento e maiúscula no período de armazenamento não diferem significativamente entre si pelo teste de tukey $p \leq 0,05$.

Luminosidade da casca (L) da casca %					
Tratamentos	Armazenamento (dias)				
	0	03	06	09	12
SI	-9,02 aA	-12,56 aA	-8,19 aA	-9,24 aA	-8,32 bA
I	-8,29 aA	-9,56 aA	-7,12 bA	-	-
Ca	-8,32 aAB	-11,53 aA	-8,51 aAB	-9,90 aA	-11,18 aA
PME+Ca	-9,11 aA	-12,84 aA	-10,54 aA	-7,59 aA	-9,41abA
Cromaticidade a da casca					
Tratamentos	Armazenamento (dias)				
	0	03	06	09	12
SI	12,69 aAB	19,49 aA	10,58 bAB	13,40 bAB	12,17 bAB
I	11,47 aA	8,38 bB	12,42 abA	-	-
Ca	11,18 aA	17,97 aA	18,33 aA	20,96 aA	23,21 aA
PME+Ca	12,24 aAB	21,33 aA	17,05 aA	21,94 aA	15,55 aA
Cromaticidade b da casca					
Tratamentos	Armazenamento (dias)				
	0	03	06	09	12
SI	29,92 bA	38,03 aA	34,41 aA	39,85 aA	37,88 aA
I	34,37 aA	36,14 aA	33,52 aA	-	-
Ca	35,12 aA	38,12 aA	38,74 aA	42,40 aA	36,79 aA
PME+Ca	35,14 aA	42,55 aA	38,24 aA	35,28 aA	37,54 aA
Intensidade da cor da casca (C)					
Tratamentos	Armazenamento (dias)				
	0	03	06	09	12
SI	15,60 aAB	23,16 aA	16,75 aA	16,52 aA	14,79 bB
I	14,00 aA	14,12 aA	14,48 aA	-	-
Ca	13,94 aB	21,40 aA	20,23 aA	27,14 aA	28,02 aA
PME+Ca	15,27 aB	24,93 aA	16,52 aAB	23,59 aA	18,65 aA
Ângulo de hue (h)					
Tratamentos	Armazenamento (dias)				
	0	03	06	09	12
SI	127,09 aA	122,84 aA	129,14 aA	123,51 aA	125,51 aA
I	126,05 aA	129,22 aA	120,48 aA	-	-
Ca	126,99 aA	89,86 bB	114,79 aA	121,11 aA	108,16 aA
PME+Ca	126,76 aA	121,46 aA	121,99 aA	109,12 aA	113,70 aA

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de tukey $p \leq 0,05$. As médias estão apresentadas com seus desvios padrão. (-) Amostras que não se mantiveram adequadas para análises.

Tabela 5.2 - Teor de sólido sólúveis totais (%), pH e acidez total (%), nos tratamentos sem infusão (SI), infusão em água (I), infusão em cloreto de cálcio (Ca) e infusão em pectina metil esterase com cloreto de cálcio (PME+Ca) em pimentões armazenados ao longo de doze dias a 20°C ± 1°C em B.O.D. e 75% UR.

Variáveis	Armazenamento (Dias)	Tratamentos			
		SI	I	Ca	PME+Ca
Teores de sólidos totais (%)	0	4,63±0.1 aA	4,40±0.2 aB	3,96±0.03 bcB	3,73±0.2 cB
	03	4,30±0.3 bA	4,00±0.1 bB	3,46±0.1 cC	6,00±0.08 aA
	06	4,60±0.1 aA	3,10±0.2 bC	4,20±0.6 aB	4,56±0.08 aA
	09	4,53±0.3 aA	5,03± 0.9 aA	5,10±0.07aA	2,65±0.2 bC
	12	4,96±0.3 aA	-	4,80±0.0 aA	2,53±0.06 bC
C.V. (%) 7,16					
pH	0	6,27± 0.04 aA	6,05±0.02 aA	5,80±0.01 aA	6,04±0.05 aA
	03	5,87± 0.1 aA	5,84±0.2 aA	6,05±0.1 aA	5,89±0.08 aA
	06	6,49±0.1 aA	5,50±0.5 bA	5,40±0.6 bA	6,22±0.04 aA
	09	6,05±0.03 aA	5,81±0.5 aA	6,01±0.01 aA	4,96±0.4 bB
	12	6,21±0.04 aA	-	6,28±0.2 aA	6,73±0.2 aA
C.V. (%) 7,86					
Acidez total (%ácido cítrico)	0	0,92± 0.1 aA	0,96±0.2 aB	0,79±0.03 bB	0,87±0.2 abB
	03	0,85±0.3 aA	0,70±0.1 aB	0,77±0.1 aB	0,86±0.08 aB
	06	1,02±0.1 bA	3,13±0.2 aA	1,52±0.6 bA	1,44±0.08 bA
	09	0,23±0.3 aB	0,23±0.9 aC	0,17±0.07 bC	0,39±0.2 aC
	12	0,23±0.2 aB	-	0,15±0.0 bC	0,20±0.06 aC
C.V. (%) 32,20					

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de tukey $p \leq 0.05$. As médias estão apresentadas com seus desvios padrão. (-) Amostras que não se mantiveram adequadas para análises.

6. ARTIGO 2: UTILIZAÇÃO DE PECTINA METIL ESTERASE E CLORETO DE CÁLCIO NO CONTROLE DA PODRIDÃO-MOLE EM PIMENTÃO

Periódico a ser submetido: Pesquisa Agropecuária Brasileira

RESUMO

Resumo – O objetivo utilizar o cloreto de cálcio e pectina metil esterase exógena para promover uma melhor firmeza do fruto e consequentemente controlar a podridão-mole em pimentão. Os parâmetros estimados foram à severidade da doença (SD), a firmeza do fruto (FF) e a atividade de pectina metil esterase (PME). Os resultados indicam que a metodologia de infusão a vácuo não é a mais indicada para os frutos de pimentoeiro e que o uso de solutos de cloreto de cálcio é eficiente para o controle da bactéria, pois promove uma melhora na firmeza e reduz o efeito da PME endógena.

Termos de indexação: *Capsicum annum* L., *pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorum*, infusão com cloreto de cálcio.

ABSTRACT:

Title: Calcium chloride use in control of rot-mole in pepper

The object of using calcium chloride and methyl exogenous pectin esterase to promote better fruit firmness and consequently control the soft rot in Chile. The estimated parameters were the severity of the disease (SD), the firmness of the fruit (FF) and pectin methyl esterase activity (SMEs). The results indicate that the vacuum infusion method is not the most suitable for fruit pimenteiro and that the use of calcium chloride solute is effective for controlling bacteria, it promotes an improvement in the firmness and reduces the effect of SMEs endogenous.

Index terms: *Capsicum annum* L., *Pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorum*-Pcc, infusion with calcium chloride.

6.1. Introdução

O pimentão *Capsicum annum* L. (Solanaceae), por ser um alimento rico em nutrientes, possui grande importância econômica. Seus frutos, no entanto, são facilmente afetados por problemas fitossanitários, o que diminui a qualidade do produto, levando as perdas na pós-colheita. Nesta fase podem ocorrer alterações das propriedades químicas do fruto, principalmente na firmeza, devido a alterações na parede celular (na lamela média), aumentando sua suscetibilidade a fitomoléstias, e assim limitando sua vida útil para a comercialização (Chitarra e Chitarra, 2005).

A perda de firmeza no pimentão pode se tornar uma porta de entrada para patógenos, como a bactéria *Pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorum*-Pcc, (Jones) Hauben et al. (sin. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) (Jabuonski e Takatsu, 1986) agente causal da podridão-mole, uma das doenças que mais afeta a pós-colheita da cultura do pimentão. Essa doença é ocasionada pela degradação da parede celular por enzimas pectolíticas, como pectina metil esterase (PME) (EC 3.1.1.11) e poligalacturonase (PG) (EC 3.2.1.15) (Pérombelon e Van Der Wolf, 2002).

No entanto a PME quando aplicada exogenamente e associado ao cálcio interage sucessivamente formando os pectatos de cálcio que ocasiona redução na degradação da parede celular do fruto (Martín-Diana et al., 2006; Degraeve et al., 2003) fazendo com que tal associação (pectina metil esterase exógena com o cálcio) permita manter a firmeza no fruto (Galleto et al., 2010).

O cloreto de cálcio promove uma melhor firmeza, aumentando a vida útil do fruto, pois tem um importante papel nas funções celulares incluindo a redução no amolecimento, evitando lesões e consequentemente a entrada de patógenos (Barker e Pilbeam, 2007). Os íons presentes no cálcio se ligam às pectinas da parede celular, dificultando a degradação da mesma por enzimas pectolíticas produzidas pelos patógenos (Gomes et al., 2005). Alguns estudos confirmam a eficiência do uso de cálcio para o controle da podridão mole em couve-chinesa, alface, tomate e batata (Gomes et al., 2005; Felix, 2012; Ngadze et al., 2014).

Assim, este trabalho teve como objetivo utilizar a PME exógena e o cloreto de cálcio para promover a melhoria da firmeza do fruto e o controle da podridão-mole em pimentão.

6.2. Material e Métodos

O experimento foi realizado no laboratório de ecofisiologia e pós-colheita da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão/SE. Foram utilizados frutos de pimentoeiro, cultivar Yolo Wander (Cv.) e um isolado de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*- Pcc. A Pcc foi isolada de pimentão com a doença em estágio inicial, mantida em placas de petri em meio de cultura BDA (Batata dextrose Agar), acondicionadas em B.O.D a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e repicadas de acordo com a necessidade (Mariano e Silveira 2005). O teste de patogenicidade e a confirmação da identidade do isolado foram realizados segundo trabalhos descritos por (Takatsu et al., 1981). Os frutos foram inoculados e mantidos em câmara úmida (umidade relativa de $92 \pm 4\%$) por 48 horas, até o aparecimento dos sintomas típicos da doença, procedendo-se o reisolamento e a repicagem da bactéria em meio BDA.

Os pimentões foram submetidos à infusão a vácuo em um dessecador com manômetro acoplado a uma bomba a vácuo (modelo 8300; Diagtech). O fruto inteiro foi imerso em um Becker de vidro de 600 ml com 375 ml de solução aquosa. Foi utilizado uma pressão de 200 mmHg por 5 minutos de modo que não houvesse mais saída de bolhas de ar, tanto da solução quanto do fruto (Mcguire e Kelman 1984). Os tratamentos foram os frutos em infusão com H_2O destilada mais a Pcc (I+Pcc), frutos em infusão com cloreto de cálcio 7% mais Pcc (I+Ca+Pcc) e infusão com PME mais cloreto de cálcio 7% mais Pcc (PME+Ca+Pcc) e os controles frutos sem infusão e sem PCC (SI), frutos sem infusão mais a Pcc (SI+Pcc). A concentração de 7% de cloreto de cálcio foi determinada por pré-testes em pimentões.

Em seguida os frutos foram colocados em bancadas para secagem e inoculados com 10 μL de uma suspensão bacteriana com concentração de 10^6 UFC/mL, sobre os frutos sem fermento, onde a parede de cada fruto foi demarcada com um pincel, para a identificação do ponto de inoculação. Após a aplicação da Pcc, os frutos foram acondicionados em B.O.D. com controle de temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa ($75\% \pm 1\%$). Foram feitas avaliações a cada três dias nos frutos com o isolado Pcc com um auxílio de uma régua. A severidade da doença foi estimada através de uma escala descritiva de 1 a 6, sendo: 1 = Sem lesão no ponto de inoculação; 2 = Lesões menores que 5 mm; 3 = Lesões entre 5 e 10 mm; 4 = Lesões maiores que 10 mm; 5 = Fruto próximo da degradação e 6 = Fruto degradado (Ren et al., 2001).

Foram feitas análises físico-químicas: A Firmeza do fruto – FF: utilizou-se o penetrômetro digital (Turoni), com ponteira de 8 mm de diâmetro. Realizou-se a medição com duas leituras em cada fruto. Os resultados obtidos foram expressos em Newton (N). Atividade da Pectina metil esterase – PME: foram homogeneizada 25 g da polpa com 50 mL de NaCl 0,2 N o homogenato foi filtrado em gaze, o pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 0,1 N e o novo homogenato incubado a 4°C por uma hora em agitação. O material foi centrifugado a 25.000 g, por quinze minutos, a 4°C . O sobrenadante resultante constituiu-se o extrato enzimático. Para determinação da atividade utilizou-se uma alíquota de 6 mL de extrato e a ela adicionou-se 30 mL de pectina cítrica a 1% em NaCl 0,2 N pH 7,0. A taxa de desmetilação do extrato foi medida por titulação com NaOH 0,01 N, mantendo-se o pH em 7,0 por dez minutos. Uma unidade de atividade enzimática (UAE) de pectina metil esterase foi definida como

a quantidade de enzima capaz de catalisar a desmetilação de pectina correspondente ao consumo de 1 nmol de NaOH por dez minutos. Os resultados foram expressos em UAE por grama da massa fresca por minuto (Jen e Robinson, 1984).

O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial (5x5)x3, onde foram avaliados durante doze dias com avaliações a cada três dias. Os valores foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, utilizando o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 1998).

6.3. Resultados e Discussão

Dentre os tratamentos com menor severidade da Pcc pôde-se verificar (Tab.1) que SI+Pcc e SI foram os menos afetados apresentando lesões menores do que 5mm no 9º e 12º dia respectivamente. Enquanto que os demais frutos que foram submetidos à infusão a vácuo apresentaram lesões já no terceiro dia com lesão de 5 a 10 mm para o tratamento I + Pcc e PME+Ca+Pcc, sendo este último com lesões menores de 5 mm. No caso dos frutos tratado com cálcio (I+Ca+Pcc) as lesões surgiram apenas no sexto dia e menores de 5mm. Provavelmente a maior incidência de lesões nos frutos com infusão a vácuo tenha ocorrido em função de o pimentão ser um fruto oco e de espessura fina, o que promoveu alterações celulares indesejáveis, pois o mesmo tem capacidade limitada de armazenar água (Maalekuu et al., 2003).

Mesmo o pimentão não sendo o mais indicado para esta técnica, o tratamento I+Ca+Pcc chegou ao término do armazenamento (12º dia) com o mesmo nível de lesões dos frutos sem infusão e sem a inoculação da Pcc. Resultados similares também foram obtidos por Silva et al. (2014) e Melo et al. (1995) com pimentão e Gomes et al. (2005) com tomate onde o uso de cálcio foi eficiente para o controle da podridão-mole no fruto. Confirmando assim que o cálcio auxilia na regularização do metabolismo dos frutos pela ação dos íons presentes no cálcio se unirem às pectinas da parede celular, dificultando a degradação, mantendo-se uma firmeza consistente e diminuindo assim a incidência de patógenos.

A firmeza do tratamento I + Pcc (Fig. 1) foi drasticamente reduzida variando de 25,03 a 4,33N até o 6º dia, devido ao incremento da atividade da PME de 410000 unidades neste período sendo responsável pela degradação da parede celular. O comportamento desses dois fatores foi devido à infusão a vácuo e sem a adição de soluto (Ca^{++}) que pudesse atenuar o efeito. Como consequência dessa perda de firmeza acentuada obteve-se a maior severidade das lesões no 3º dia (nota 3) e o comprometimento total no 6º dia com fruto próximo a degradação (nota 5). Ao adicionar PME exógena ao fruto (I + PME + Pcc) a perda de firmeza foi atenuada, onde observou-se o decréscimo de 14,72N até o 6º dia e chegando ao término do armazenamento com 8N, fazendo com que a severidade da doença fosse menor no 3º e 6º dia, contudo não diferisse nos dois períodos finais (nota 6) quando comparado ao I + Pcc.

Os tratamentos sem infusão (SI), sem infusão mais Pcc (SI + Pcc) e infusão com cálcio e Pcc (I+Ca+Pcc) apresentaram as menores atividades da PME e consequentemente as menores perdas de firmeza. Da mesma forma que Chardonnet et al. (2000) relataram a menor atividade de PME e PG, sendo um efeito positivo no controle da podridão com uso de cálcio em maçãs. Com a menor perda de firmeza (I+Ca+Pcc) os frutos chegaram ao término do armazenamento com lesões inferiores a

5mm (nota 2), Indicando que mesmo que a metodologia de infusão a vácuo não seja a mais indicada para o pimentão quando adicionou-se o CaCl_2 fez com que o problema da infusão fosse atenuado fazendo com que os resultados igualassem aos frutos sem infusão, pois à atuação do cloreto de cálcio na regulação do amolecimento do fruto formando pontes entre os ácidos pécticos e polissacarídeos, ou seja, sua complexação a parede celular e lamela média de resíduos de ácidos galacturônicos atribuíram uma melhora na integridade estrutural do fruto (Mota et al., 2002).

6.4. Conclusões

Os resultados indicam que a metodologia de infusão a vácuo não é a mais indicada para os frutos de pimentoeiro e que o uso de solutos de cloreto de cálcio é eficiente para o controle da bactéria, pois promove um aumento da firmeza e reduz o efeito da PME endógena.

6.5. Referências Bibliográficas

- BARKER, A.V.; PILBEAM, D.J. **Handbook of plant nutrition**: Introduction. Boca Raton, 2007. 3-18p.
- CHARDONNET, C.O; SAMS, C.E; TRIGIANO, R.N; CONWAY, W.S. Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. **Phytopathology**, v.90, p.769-774, 2000.
- CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: UFLA, 2005, 785p.
- DEGRAEVE, P.; SAUREL, R.; COUTEL, Y. Vacuum impregnation pretreatment with pectin methylesterase to improve firmness of pasteurized fruits. **Journal of Food Science**, v.68, p.716–721, 2003.
- FELIX, K.C. da S. **Manejo da podridão mole em couve-chinesa e alface**. 2012.83p. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- FERREIRA, D.F. **Sisvar - sistema de análise de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 1998. 19 p.
- GALETTO, C.D.; ROXANA, A.; VERDINI, R.A.; SUSANA, E.Z.; RUBIOLO, A.C. Freezing of strawberries by immersion in CaCl_2 solutions. **Food Chemistry**, v.123, p.243–248, 2010.
- GOMES, A.M.A; SILVEIRA E.B; MARIANO, R. L.R. Tratamento pós-colheita com cálcio e microrganismos para controle da podridão-mole em tomate. **Horticultura Brasileira**, v.23, p.108-111, 2005.

JABUONSKI, R.E; TAKATSU, A; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Avaliação de patogenicidade de bactérias do gênero *Erwinia* isoladas da batateira, tomateiro e outras plantas hospedeiras. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.587,1986.

JEN, J.J.; ROBINSON, M.L.P. Pectolytic enzymes in sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Food Science**, v.49, p.1045-1087, 1984.

MAALEKUU, K.; ELKIND, Y.; TUVIA-ALKALAI, S.; SHALOM, Y.; FALLIK, E. 2003. Quality evaluation of three sweet pepper cultivars after prolonged storage. **Adv Hort Sci**, v.17, p.187–191, 2003.

MARIANO, R. de. L.R.; SILVEIRA E.B.da. **Manual de práticas em Fitobacteriologia**: Quantificação de inóculo de bactérias fitopatogênicas. 2 ed. Recife: Fundação Biblioteca nacional. 2005, 184p.

MARTÍN-DIANA, A.B.; RICO, D.; FRÍAS, J.; HENEHAN, G.T.M.; MULCAHY, J.; BARAT J.M. Effect of calcium lactate and heat-shock on texture in fresh-cut lettuce during storage. **Journal of Food Engineering**. 77, 1069–1077, 2006.

MCGUIRE, R.G.; KELMAN, A. Reduce severity of *Erwinia* soft rot in potato tubers with increase calcium content. **Phytopathology**, v.74, p.1250-1256, 1984.

MELO, R.A.G; MARIANO, R.L.R; MICHEREFF, S.J; MENEZES, M; COELHO, R.S.B. Controle biológico da podridão-mole do pimentão (*Capsicum annum*) causada por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Summa Phytopathologica**, v.21, p.206-212, 1995.

MOTA, W.F. DA; SALOMÃO, L.C.C.; PEREIRA, M.C.T.; CECON, P.R. Influência do tratamento pós-colheita com cálcio na conservação de jabuticabas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.49-052, 2002.

NGADZE, E; COUTINHO, T.A; ICISHAHAYO, D; VAN DER WAALS, J.E. Effect of calcium soil amendments on phenolic compounds and softrot resistance in potato tubers. **Crop Protection**, v,62, p.40-45, 2014.

PÉROMBELON, M.C.M. & VAN DER WOLF, J.M. **Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes**: a laboratory manual. 2. ed. Invergowrie. Scottish Crop Research Institute, 2002. 82p.

REN, J; PETZOLDT, R; DICKSON, M.H. Genetics and population improvement resistance to bacterial soft rot chinese cabbage. **Euphytica**, v.117, p.197-207, 2001.

SILVA e SILVA, M; CARVALHO, F.C.Q; SILVA. J.R. da; LINS, S.R. de. O; OLIVEIRA, S.M. de. A. Uso de antagonistas e produtos alternativos no manejo pós-colheita de podridão mole em pimentão. **Revista Ciência Agronômica**, v,45, p.718-725, 2014.

TKATSU, A.; MELLO, S.C.M; GARCIA, E.S.O.B. Fruto de pimentão como meio parcialmente seletivo para isolamento de *Erwinia caratovora*. **Fitopatologia brasileira**, v.6, p.550-551, 1981.

YAMAMOTO, E.L.; FERREIRA, R.M.; FERNANDES, P. L. O.; ALBUQUERQUE, L. B.; ALVES, E. O. Função do cálcio na degradação da parede celular vegetal. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.6, p.49-55, 2011.

Tabela 6.1. Avaliação da severidade da *Pcc*, de acordo com a escala, 1 = Sem lesão no ponto de inoculação; 2 = Lesões menores que 5 mm; 3 = Lesões entre 5 e 10 mm; 4 = Lesões maiores que 10 mm; 5 = Fruto próximo da degradação e 6 = Fruto degradado. Tratamentos sem infusão sem a *Pcc* (SI), sem infusão com a *Pcc* (SI+*Pcc*), infusão em água mais a *Pcc* (I+*Pcc*), infusão em cloreto de cálcio e a *Pcc* (I+Ca+*Pcc*) e infusão em PME + cálcio e a *Pcc* (PME+Ca+*Pcc*).

Tratamentos	Armazenamento (Dias)				
	0	03	06	09	12
SI	1	1	1	1	2
SI+ <i>Pcc</i>	1	1	1	2	2
I+ <i>Pcc</i>	1	3	5	6	6
I+Ca+ <i>Pcc</i>	1	1	2	3	2
PME+Ca+ <i>Pcc</i>	1	2	4	6	6

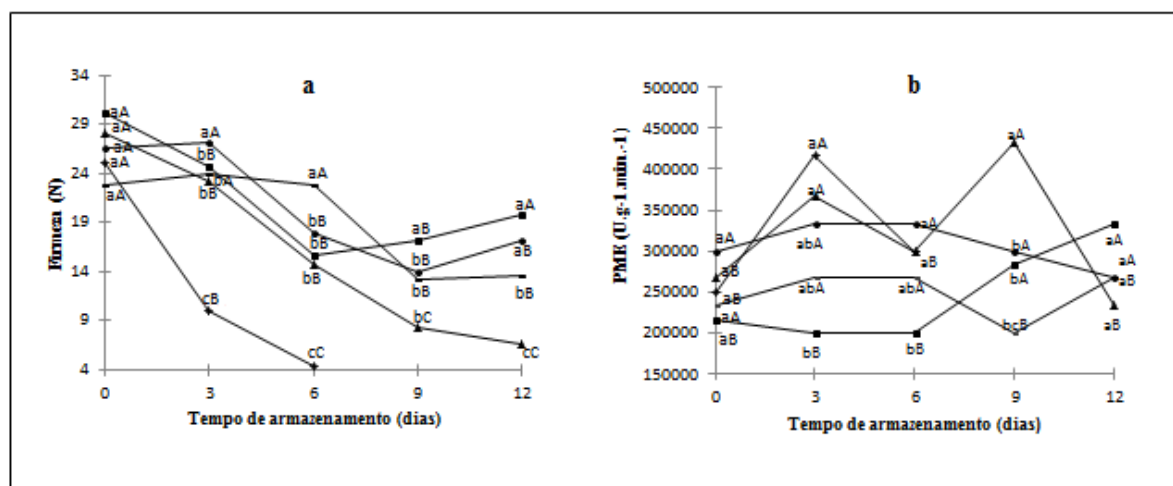


Figura 6.1 – Firmeza (a) e PME (b) em pimentões submetidos aos tratamentos ■ - SI (sem infusão, sem *Pcc*), - - SI+*Pcc* (sem infusão e com *Pcc*) ♦ - I+*Pcc* (infusão com água e a *Pcc*), ● – I+Ca+*Pcc* (infusão com cloreto de cálcio e com *Pcc*) e ▲ - PME+Ca+*Pcc* (infusão com pectina metil esterase + cloreto de cálcio e com *Pcc*) armazenados ao longo de doze dias a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em B.O.D. As médias seguidas pela mesma letra minúscula no tratamento e maiúscula no período de armazenamento não diferem significativamente entre si pelo teste de tukey $p \leq 0,05$.

ANEXOS

QUADRO 1 – Resumo da análise de variância de Acidez total (AT), Firmeza do fruto (FF), pH, perda de massa fresca (PMF) e Atividade de PME (ATPME) e cor. Experimento: Efeito da PME+CC na firmeza do pimentão.

F.V.	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS						
		AT	FF	pH	PMF	SS	ATPME	COR
Tratamento	3	0,953327*	100.84893*	0.369613 ^{ns}	58.571619*	1.329316*	6.48830409*	6.560637 ^{ns}
Tempo	4	4.703605*	343.33788*	0.557714 ^{ns}	9375.3820*	0.245206 ^{ns}	4.47733918 ^{ns}	12.260198 ^{ns}
TratxTempo	12	0.525387*	50.401214*	0.418602 ^{ns}	250.27680*	3.241986*	1.22961190*	15.775388*
Resíduo	40	0.074286	8.386381	0.219414	16.930257	0.092237	5.96491228	5.020530
Total	59							
CV%		32,20	14,38	7,86	15,68	7,16	25,45	25,10

* F significativo a 5% de probabilidade

^{ns} F não significativo a 5% de probabilidade

QUADRO 2 – Resumo da análise de variância Firmeza do fruto (FF) e Atividade de PME (ATPME). Experimento: Efeito do CC no controle da *Pcc* no pimentão.

F.V.	G.L.	FF	ATPME
Tratamento	4	257.60976*	1.9966183*
Tempo	4	413.58842*	1.9907155*
Trat xTempo	16	131.30330*	1.0470971*
Resíduo	50	7.318951	4.42028986
Total	74		
CV%		14,02	22,38

* F significativo a 5% de probabilidade

^{ns} F não significativo a 5% de probabilidade