

INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO ETILENO NA ATIVIDADE DA
H⁺-ATPase DE MEMBRANA PLASMÁTICA DURANTE O
AMADURECIMENTO DO MAMÃO (*CARICA PAPAYA L.*) 'GOLDEN'

CLARA-LUZ DA AURORA DOS SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO-UENF
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AGROPECUÁRIAS
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
DEZEMBRO DE 2009

INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO ETILENO NA ATIVIDADE DA
H⁺-ATPase DE MEMBRANA PLASMÁTICA DURANTE O
AMADURECIMENTO DO MAMÃO (*CARICA PAPAYA* L.) 'GOLDEN'

CLARA-LUZ DA AURORA DOS SANTOS

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Dr. Jurandi Gonçalves de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

DEZEMBRO DE 2009

INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO ETILENO NA ATIVIDADE DA
H⁺-ATPase DE MEMBRANA PLASMÁTICA DURANTE O
AMADURECIMENTO DO MAMÃO (*CARICA PAPAYA* L.) 'GOLDEN'

CLARA-LUZ DA AURORA DOS SANTOS

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 16 de Dezembro de 2009

Comissão examinadora:

Dr. Alessandro Coutinho Ramos (Dr. Sc. Produção Vegetal) - UENF

Dra. Elaine Cristina Cabrini (Dr. Sc. Fisiologia Vegetal) - UFV

Prof. Marcelo Gomes da Silva (Dr. Sc. Física) – UENF

Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha (Dr. Sc. Química Biológica) – UENF
(Co-Orientador)

Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira (Dr. Sc. Biologia Vegetal) – UENF
(Orientador)

À força maior por trás de tudo, a qual me dá a força que me permite vencer até mesmo quando eu não acredito.

Dedico este trabalho.

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver.”*

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

À força onipotente, onipresente e onisciente que guia a tudo e a todos;
À minha mãe, que me apoiou e apóia incondicionalmente;
Ao meu pai, por me inspirar com sua força imensa;
À minha irmã Amazona, por estar sempre ao meu lado;
À minha irmã Magna-Lux, por me alegrar todos os dias com sua eterna felicidade;
A meus irmãos Adriana-Flor, Ananda e Paulo, pelo carinho;
Ao meu eterno amigo Bruno, por me apoiar e ajudar durante toda esta jornada acadêmica;
À minha amiga de todas as horas Inga, por me ajudar, me instruir, me divertir, me apoiar incondicionalmente em todos os momentos neste trabalho;
Ao Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira, pela orientação, paciência, incentivo e compreensão em todos os momentos difíceis que passei;
Ao Prof. Arnaldo Rocha Façanha, pela co-orientação, dicas e incentivo;
Ao Prof. Marcelo Gomes da Silva, pela colaboração nas análises dos gases, e a toda sua equipe, Wily, Gustavo, Sávio, pela imensa ajuda e grande amizade;
A empresa Caliman Agrícola, por ceder os frutos e local para experimentos;
A todos os membros do LMGV pela amizade, carinho, ajuda e força em todas as ocasiões;
Ao Scooby pela ajuda e pelos momentos de distração;

Aos amigos Karine, Gleidson, Thais, Tiago, Luciane, Viviane, Mirella, Sílvia, Juliana, Anderson, Marcão, e todos os outros que não citei aqui, pelos ótimos momentos de distração;

Aos Professores participantes da banca Dr. Alessandro, Dr^a. Elaine, Prof. Dr. Marcelo Gomes, por aceitarem fazer parte da mesma e contribuir para este trabalho;

Às minhas amigas e companheiras de casa Érika e Carolina pela imensa amizade e apoio durante esta longa jornada;

A todos que participaram direta ou indiretamente da execução deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	05
2.1 O mamão.....	05
2.1.1 Aspectos culturais.....	05
2.1.2 Desenvolvimento do fruto.....	06
2.1.3 Características do fruto.....	09
2.1.4 Aspectos econômicos.....	12
2.2 Respiração do fruto.....	13
2.3 Emissão de Etileno do fruto.....	14
2.4 H⁺- ATPase de membrana plasmática.....	17
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Delineamento experimental.....	24
4.2 Material Vegetal.....	24

4.3 Aplicação dos tratamentos.....	24
4.3.1 Amadurecimento natural.....	25
4.3.2 Indução do amadurecimento.....	25
4.3.3 Inibição do amadurecimento.....	26
4.4 Análises gasosas.....	27
4.4.1 Medidas da emissão de Etileno.....	27
4.4.2 Medidas da respiração.....	27
4.5 Caracterização do estágio de desenvolvimento do fruto.....	28
4.5.1 Determinação da coloração da casca.....	28
4.5.2 Determinação da firmeza da polpa.....	29
4.5.3 Determinação do teor de sólidos solúveis.....	29
4.5.4 Determinação da Acidez Total Titulável.....	29
4.6 Atividade de H⁺- ATPase tipo P.....	30
4.6.1 Obtenção das vesículas.....	30
4.6.2 Determinação de proteínas totais.....	31
4.6.3 Atividade hidrolítica da H⁺- ATPase do tipo P.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 Avaliação do amadurecimento natural dos frutos.....	32
5.2 Indução do amadurecimento.....	39
5.3 Inibição do amadurecimento.....	46
6. CONCLUSÃO.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

RESUMO

SANTOS, Clara-Luz da Aurora dos; M. Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, dezembro de 2009. Influência do Hormônio Etileno na atividade da H^+ -ATPase de membrana plasmática durante o amadurecimento do mamão (*Carica Papaya* L.) 'Golden'. Orientador: Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira. Co-orientador: Arnaldo Rocha Façanha.

O Brasil é hoje o maior produtor e o terceiro maior exportador de frutos de mamoeiro, sendo responsável por 25% da produção mundial. O mamão se caracteriza por uma vida pós-colheita relativamente curta, o prolongamento do tempo de prateleira destes frutos é um fator de importância econômica para a comercialização deste produto no mercado externo. Estudos têm sido feitos para ampliar o conhecimento dos processos bioquímicos envolvidos no desenvolvimento de frutos com o objetivo de elucidar fatores passíveis de manipulação, controle ou interferência, possibilitando modificações que permitam estender a vida útil (tempo de prateleira) destes frutos. O presente trabalho teve como objetivo verificar a relação entre a atividade da enzima H^+ -ATPase de membrana plasmática, e a emissão de etileno durante o processo de amadurecimento em frutos de mamão cultivar Golden, sob amadurecimento natural, indução e inibição do amadurecimento. Os resultados obtidos demonstraram que os frutos tratados com etileno tiveram seu pico de etileno antecipado em 3 dias, e características do processo de amadurecimento como coloração e diminuição da firmeza também antecipados com relação aos frutos

controle, sem que houvesse alterações no teor de sólidos solúveis totais. A atividade da bomba de prótons foi diminuída nestes frutos. Os frutos tratados com 1-MCP tiveram seu pico de etileno atrasado em dois dias e mantiveram a firmeza e a coloração verde por mais tempo. Nestes frutos a atividade da H⁺-ATPase do tipo P manteve-se relativamente alta durante quase todo o período de amadurecimento se comparado aos frutos controle. Os frutos amadurecidos naturalmente apresentaram um padrão de atividade da bomba de prótons no qual esta diminui quando há o aumento na emissão de etileno (durante o pico climatérico). Estes resultados sugerem fortemente que o hormônio etileno age como um modulador negativo da atividade da bomba de prótons de membrana plasmática.

ABSTRACT

SANTOS, Clara-Luz da Aurora dos; M. Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Dezembro 2009. Influence of Hormone Ethylene in the activity of H⁺-ATPase of plasma membrane during ripening of papaya (*Carica papaya* L.) 'Golden'. Adviser: Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira. Co-adviser: Arnaldo Rocha Façanha.

Brazil is today the world's biggest producer and the third biggest exporter of papaya fruits. Papaya is characterized by a relatively short post-harvest life, the extension of the shelf-life of these fruits is a factor of economical importance to the commercialization of this product on the foreign market. Studies have been made to expand the knowledge of the biochemical processes involved on the growing of fruits with the objective of elucidate factors likely to be manipulated, controlled or interfered, enabling modifications that allow extend these fruits shelf-life. The presenting research had as objective: verify the relation between the activity of the H⁺-ATPase enzyme of plasmatic membrane, and the emission of ethylene during the process of ripening in cultivar golden papaya fruits, under natural, induction and inhibition of ripening. The obtained results show that the fruits treated with ethylene had their rise of ethylene anticipated in three days, and characteristics of the process of ripening such as coloration, and decrease of consistence anticipated as well when compared with the control fruits, without alterations of the content of the total soluble solids. The activity of the proton pump was decreased in these fruits. The fruits treated with 1-MCP had their rise of ethylene delayed in 2

days and kept their consistence and green coloration for longer time. In these fruits the H⁺-ATPase P type activity remained relatively high for almost totally the ripening period in comparison with the control fruits. The naturally ripening fruits presented a pattern in proton pump activity wherein decreasing when exist a rise of ethylene emission (during climacteric peak). This result strongly suggests that hormone ethylene do act as an agent negative regulator of plasmatic membrane proton pump activity.

1. INTRODUÇÃO

O mamão é um fruto de grande importância no cenário econômico da fruticultura no Brasil. O Brasil é hoje o maior produtor e o terceiro maior exportador deste fruto, sendo responsável por 25% da produção mundial. O mamão é o sétimo fruto *in natura* mais exportado no país, sendo cultivado principalmente nos estados do Espírito Santo e Bahia, que juntos são responsáveis por 70% da produção nacional (SEAG, 2007).

O fruto de mamoeiro se caracteriza por uma vida pós-colheita relativamente curta. Existem vários fatores de pré e pós-colheita, bióticos e abióticos, que podem reduzir ainda mais a sua vida de prateleira. Esses fatores proporcionam perdas quantitativas e, ou, qualitativas nas diferentes fases da comercialização (Costa e Balbino, 2002). O conhecimento dos processos bioquímicos envolvidos no desenvolvimento de frutos é de extrema importância para a manutenção pós-colheita dos mesmos. A elucidação do funcionamento e da interação entre os diferentes componentes destes processos objetiva ampliar o conhecimento sobre os fatores passíveis de manipulação, controle ou interferência, possibilitando modificações que permitam estender a vida útil (tempo de prateleira) destes frutos. O maior tempo de prateleira de frutos de mamão é um fator de grande importância econômica para a comercialização deste produto no mercado

externo, o que possibilitaria maior competitividade aos exportadores brasileiros.

O processo de amadurecimento de frutos é uma fase do desenvolvimento complexa que envolve muitas mudanças bioquímicas no metabolismo celular (Kays, 1994). O etileno possui um importante papel nas mudanças fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante este processo (Bartz & Brecht, 2003). Este fitormônio gasoso é conhecido como um indutor do climatério respiratório, que consiste em um aumento da atividade respiratória e a emissão de um pico de etileno, em um período da fase do amadurecimento (Chitarra & Chitarra, 2005). O climatério é uma importante fase no amadurecimento dos frutos, sendo necessária sua melhor caracterização. O mamão é um fruto climatérico, neste fruto o pico climatérico ocorre simultaneamente com a fase do amadurecimento, momento no qual o fruto apresenta melhores atributos de qualidade para consumo (Manica et al., 2006).

Alguns trabalhos têm relatado o envolvimento do etileno durante o amadurecimento de frutos com alguns elementos do sistema de transporte de membrana plasmática, mas ainda se sabe pouco sobre este mecanismo e sua forma de atuação. Azevedo et al. (2008) relatam a influência do etileno em outros componentes do metabolismo celular, surgindo como modulador de sistemas de transporte de membranas, os quais estão envolvidos na troca de íons e metabólitos que ocorre durante o processo de amadurecimento. Um dos principais sistemas envolvidos neste fenômeno é H^+ -ATPase de membrana plasmática, esta bomba de prótons parece exercer forte influência no metabolismo do amadurecimento através de alterações no pH e no balanço iônico, em diversos frutos.

Estas bombas eletrogênicas de membrana plasmática possuem como papel principal a ativação do transporte secundário, através da formação de um gradiente eletroquímico produzem a energia necessária para o transporte de diversos compostos orgânicos e íons inorgânicos (Morsomme & Boutry, 2000). A H^+ -ATPase do tipo P possui um papel importante no controle do pH citoplasmático e do apoplasto, na ativação de enzimas líticas de parede celular e na integridade e funcionalidade da membrana

(Morsomme & Boutry, 2000), sendo essencial na regulação da homeostase celular durante o amadurecimento de frutos.

Azevedo et al. (2008) observaram uma diminuição na hidrólise de ATP pela H⁺-ATPase do tipo P em mamão 'Golden' coincidente com o pico de emissão do etileno, demonstrando um possível mecanismo pelo qual o etileno regula o transporte de solutos durante o climatérico em frutos de mamoeiro. Já para pepino (*Solanum muricatum*), um fruto não-climatérico, Heyes & Vré (1997) encontraram resultados diferentes, a atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática diminuiu nos estádios iniciais e tornou a aumentar nos estádios finais de amadurecimento, contribuindo para o amolecimento destes frutos através da diminuição do pH do apoplasto com posterior ativação de enzimas de degradação de parede. Ben-Arie & Faust (1980) encontraram resultados semelhantes para frutos de morango, onde a atividade da bomba de prótons foi maior com o amadurecimento, contribuindo para o amolecimento dos frutos.

Apesar da diminuição da hidrólise de ATP da H⁺-ATPase do tipo P verificada por Azevedo et al. (2008) nos estádios iniciais de amadurecimento em frutos de mamoeiro, verificou-se um representativo gradiente de prótons durante o estágio pós-climatérico nestes frutos, mostrando que apesar da baixa hidrólise de ATP, a atividade de bombeamento de prótons parece ser preservada durante os estádios finais de amadurecimento. Desta forma, o bombeamento de prótons pela H⁺-ATPase de membrana plasmática em mamão, poderia estar contribuindo para a diminuição no pH do apoplasto e influenciando no amolecimento destes frutos nas fases finais de amadurecimento. Os frutos de mamoeiro nos estádios iniciais de amadurecimento possuem grande quantidade de látex, o qual contém inúmeras enzimas proteolíticas, lipolíticas e mucolíticas, isto impossibilitou a obtenção de vesículas seladas para avaliação de um gradiente viável de prótons nos frutos durante os estádios iniciais (pré-climatéricos).

De acordo com Lurie & Ben-Arie (1983), a integridade da membrana decai com o processo de amadurecimento durante o climatérico de maçãs, com aumento em sua viscosidade e permeabilidade a íons. Sugerindo que estas mudanças na integridade da membrana são uma consequência do processo de amadurecimento de frutos. O efeito inibitório na atividade da H⁺-

ATPase do tipo P encontrada por Azevedo et al. (2008) pode estar relacionado à redução na integridade da membrana durante o processo de amadurecimento, confirmado pelo vazamento de eletrólitos. Esta redução na atividade desta bomba de prótons sugere que a ocorrência de um decréscimo abrupto na energização da membrana pode promover o colapso da célula. A idéia de que o efluxo de eletrólitos pode estar envolvido na sinalização de morte celular programada já foi vista anteriormente para sistemas animais e vegetais (Bortner et al., 1997; Atkinson et al., 1990).

Estudos adicionais precisam ser feitos para elucidar o processo de amadurecimento de frutos, os mecanismos envolvidos no controle e desencadeamento de processos, e a interação entre hormônio e sistemas de transporte ativo.

A partir dos resultados promissores obtidos por Azevedo et al. (2008), este trabalho propôs-se a avaliar a atividade da enzima H⁺-ATPase tipo P extraída de polpa de mamão 'Golden', através da caracterização de sua atividade de hidrólise de ATP e formação de gradiente de prótons, em frutos submetidos a três tratamentos diferentes: 1) amadurecimento natural do fruto (5 diferentes estádios de maturação); 2) frutos induzidos ao amadurecimento através da exposição a etileno exógeno; 3) e frutos submetidos à inibição do amadurecimento através do uso do inibidor da ação de etileno 1-metilciclopropano. O presente trabalho visa elucidar o nível de interação entre a atuação do etileno e a atividade da bomba de prótons de membrana plasmática durante o processo de amadurecimento de frutos de mamoeiro. A quantidade de etileno e CO₂ emitida pelos frutos sob os diferentes tratamentos foi avaliada, e a confirmação dos estádios de amadurecimento foi feita através da análise de variáveis como a firmeza da polpa, o teor de sólidos solúveis, a acidez total titulável da polpa dos frutos e coloração da casca.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O mamão

2.1.1 Aspectos culturais

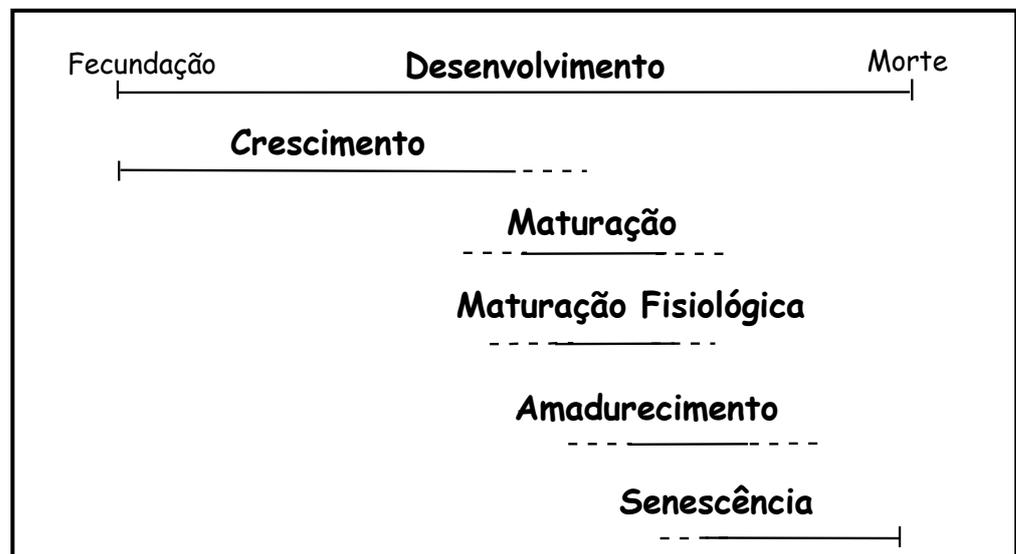
O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma das fruteiras mais cultivadas e consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Chen *et al.*, 1991). A cultura desta espécie está difundida em regiões que apresentam clima tropical, pluviosidade elevada, solos férteis e bem drenados (Marin *et al.*, 1989). A temperatura mais favorável é ao redor de 25°C. (Simão, 1998).

As cultivares que se destacam no cultivo do mamão pertencem ao grupo Solo e ao grupo Formosa. Dentre as cultivares do grupo Solo as mais cultivadas são: *Sunrise Solo*, *Improved Sunrise Solo Line 72/12* e *Baixinho de Santa Amália*. As cultivares *Sunrise Solo*, *Improved Sunrise Solo Line 72/12* por serem mais susceptíveis à Mancha Fisiológica do Mamão estão sendo substituídas pela cultivar *Sunrise Golden* (Brasil, 1994).

A cultivar Golden é originária de uma mutação natural da variedade Sunrise Solo ocorrida em lavoura comercial. Esta apresenta características distintas da original com fruto de coloração de casca mais clara, menor ocorrência de mancha fisiológica na casca, sabor menos adocicado, polpa avermelhada e possivelmente maior tempo de vida pós-colheita (Molinari, 2007).

2.1.2 Desenvolvimento do fruto

O desenvolvimento do fruto inicia-se com a fertilização da flor, seguindo-se as etapas de crescimento, maturação, amadurecimento e senescência. A diferenciação entre estas fases de forma precisa é difícil (Figura 1) (Chitarra & Chitarra, 2005). A fase de crescimento é marcada pelo aumento irreversível de atributos físicos, massa ou volume do referido órgão. A maturação é a fase do desenvolvimento onde o fruto atinge a maturidade fisiológica. A maturidade fisiológica é o estágio do desenvolvimento no qual o fruto é capaz de completar sua ontogenia ainda que destacado. A fase do amadurecimento se caracteriza por mudanças na composição, cor, textura e outros atributos sensoriais do fruto. Estas transformações resultam em características estéticas e qualidades comestíveis melhorando a aceitação do produto pelo consumidor. Finalmente a fase da senescência, que compreende os processos que procedem ao amadurecimento e levam a morte do tecido (Watada et al., 1984).



Fonte: Watada et al.,1984

Figura 1 – Diagrama esquemático mostrando as fases do desenvolvimento dos frutos.

A etapa de formação e crescimento é a primeira fase na vida do fruto, caracterizada por um rápido crescimento do ovário que se segue à polinização e fertilização. O crescimento inicial ocorre principalmente por divisão celular, e em suas últimas etapas se procede predominantemente pelo aumento do volume das células. Logo, o tamanho final do fruto é consequência do aumento do número de células, bem como do aumento no tamanho médio dessas células (Chitarra & Chitarra, 2005). De acordo com a teoria do crescimento ácido, o fenômeno de expansão celular, se dá através da acidificação do apoplasto causada pela ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática. A acidificação do meio leva a uma maior plasticidade da parede celular permitindo a alongação celular (Morsomme & Boutry, 2000).

Segundo Berilli et al. (2007), a fase de crescimento é bastante influenciada por fatores do ambiente, como temperatura, radiação solar e precipitação, além de fatores genéticos intrínsecos de cada material vegetal.

De acordo com Watada et al. (1984), a fase de maturação sobrepõe-se à do crescimento. Nesta fase ocorre uma seqüência de mudanças bioquímicas, fisiológicas e estruturais dos frutos, que conduzem estes à maturidade fisiológica, tornando-os comestíveis. Quando atinge a maturidade fisiológica o fruto se encontra com crescimento máximo e maturação adequada e mesmo depois de destacado da planta mãe é capaz de continuar sua ontogenia (Kluge, et al., 2002).

A fase final da maturação é sobreposta pelo início do processo de amadurecimento, o qual corresponde basicamente às mudanças nos fatores sensoriais de sabor, odor, cor e textura que tornam o fruto aceitável para o consumo. No amadurecimento ocorrem atividades anabólicas e catabólicas (Tabela 1), com perda de energia à medida que os substratos são convertidos em moléculas simples, calor e ATP (Chitarra & Chitarra, 2005).

Tabela 1 – Transformações que ocorrem durante o amadurecimento de frutos.

Sínteses	Degradações
Manutenção da estrutura mitocondrial	Destruição dos cloroplastos
Formação de carotenóides e antocianinas	Quebra da clorofila
Interconversão de açúcares	Hidrólise de amido
Aumento na atividade do ciclo de Krebs	Destruição de ácidos
Aumento na formação de ATP	Oxidação de substratos
Síntese de voláteis aromáticos	Inativação de fenólicos
Aumento na incorporação de aminoácidos	Solubilização de pectinas
Aumento na transcrição e tradução	Ativação de enzimas hidrolíticas
Preservação de membranas seletivas	Início do rompimento de membranas
Formação da via do etileno	Amaciamento da parede celular induzida por C ₂ H ₄

Fonte: Biale & Young, 1961 adaptado por Chitarra & Chitarra, 2005

Giovannoni (2004) observou que os processos bioquímicos, específicos, envolvidos com o fenômeno do amadurecimento variam entre as espécies. As mudanças mais marcantes incluem modificação na cor da casca através da degradação da clorofila e síntese de carotenóides e, ou, no acúmulo de flavonóides; modificação da textura via alteração do turgor celular e na estrutura de parede celular; modificação no conteúdo dos açúcares solúveis, ácidos orgânicos, e no perfil dos voláteis, afetando a qualidade nutricional, sabor e aroma do fruto; finalmente, de modo geral, há um aumento na susceptibilidade ao ataque de patógenos.

Durante o amadurecimento também ocorrem algumas mudanças na estrutura da mitocôndria, retículo endoplasmático e plasmalema, as quais são associadas a eventos metabólicos, em particular com a exportação de enzimas de degradação de parede. É visto também um distúrbio na função da membrana em frutos senescentes (pós-climatério) (Brady, 1987).

As mudanças dinâmicas que ocorrem na parede celular de um fruto em amadurecimento são controladas por diversos fatores como pH e concentração iônica do meio (Domingos & Huber, 1999). Huber &

O'Donoghue (1993) constataram que as condições iônicas do apoplasto têm influência na atividade e catálise das hidrolases de parede celular, as quais são enzimas que demonstram grande sensibilidade ao pH e à concentração iônica do meio. Heyes et al. (1997) observaram que a enzima H^+ -ATPase contribuiu para o amolecimento de pepino através da diminuição do pH apoplástico. Também foi visto para frutos de tomateiro que o amadurecimento do fruto é marcado por uma diminuição no pH do apoplasto e um aumento de íons como K^+ (Domingos & Huber, 1999).

Ainda, durante o amadurecimento ocorre o período climatérico, nesta fase ocorre uma série de mudanças bioquímicas associadas com o aumento natural da respiração e da produção autocatalítica de etileno, em especial nos frutos climatéricos (Watada et al., 1984). Esta fase da vida do fruto marca a transição entre as fases de amadurecimento e senescência, sendo caracterizada pela diminuição de resistência a doenças, pelas modificações celulares e pelas reações metabólicas, que contribuem para a deterioração do produto (Chitarra & Chitarra, 2005).

Os processos que se seguem à maturidade fisiológica que conduzem à morte dos tecidos são definidos como senescência. Entretanto, não há uma distinção bem delineada entre o amadurecimento e a senescência. O processo de senescência é manifestado quando a organização celular começa a ser destruída, aumentando a predisposição dos tecidos para a degradação, levando-os à morte quer seja por desidratação ou por invasão de microrganismos (Chitarra & Chitarra, 2005).

2.1.3 Características do fruto

A composição do fruto de mamoeiro pode variar em função da carga genética da planta, bem como por fatores do ambiente, manejo da cultura, tipo de solo e época de maturação. Serão descritos a seguir alguns dos atributos químicos e físicos do mamão, os quais podem ser utilizados para avaliar diferenças entre estádios de maturação e qualidade do fruto.

A quantidade de sólidos solúveis totais é um atributo importante na determinação da qualidade dos frutos. O valor $^{\circ}$ Brix corresponde à escala de porcentagem de matéria seca na solução de sacarose quimicamente pura.

Ele pode ser utilizado para expressar o teor de açúcares solúveis totais no suco extraído da polpa dos frutos (Almeida, 2003).

De acordo com Chitarra & Chitarra (2005), durante o amadurecimento de alguns frutos ocorre a hidrólise de carboidratos a açúcares com conseqüente aumento no teor destes. No entanto, frutos de mamoeiro não acumulam amido durante seu desenvolvimento. As mudanças no conteúdo de açúcar e o desenvolvimento da doçura após a colheita e durante o amadurecimento do fruto ainda não estão bem estabelecidos para o mamão (Paull, 1996; Gomes et al., 2002).

Existem muitas contradições acerca da síntese e acúmulo de açúcares solúveis durante o amadurecimento em frutos de mamoeiro. Segundo Gomes et al. (2002), os açúcares solúveis se acumulam nestes frutos principalmente quando estes estão presos à planta mãe. Em seu estágio inicial de desenvolvimento o fruto de mamoeiro possui a glicose como o açúcar prevalente entre os açúcares solúveis, com as mudanças na coloração da polpa e das sementes existe uma modificação no perfil de açúcares, e a sacarose torna-se o açúcar predominante (Paull, 1996; Chan et al., 1979).

Gomes et al. (2002) também verificaram que não há grandes variações no conteúdo de açúcares solúveis durante os diferentes estádios de amadurecimento em mamão, após a colheita. A diferença notada na doçura de frutos mais amadurecidos em relação aos mais verdes pode ser associada com mudanças na textura, as quais podem resultar em diferentes liberações de açúcar das células do mamão na boca durante a mastigação.

De acordo com Zhou (1999), citado por Sangwanankul & Paull (2007), a maior via de descarregamento de açúcar durante as fases finais do desenvolvimento de frutos de mamoeiro é o apoplasto. Nesta via a sacarose é invertida formando hexoses, os quais se movem através da membrana plasmática com o uso de transportadores de hexoses. Sangwanankul & Paull (2007) verificaram uma inibição na taxa de transporte de hexoses durante o desenvolvimento tardio de mamão submetido a inibidores de H⁺-ATPase do tipo P, o que indica que o transportador de hexoses de frutos de papaia pode ser dependente de energia (transporte ativo).

O mamão é um fruto de baixa acidez, geralmente apresentando valores menores que 0,2% em ácido cítrico. Sua polpa possui, em média, valores de pH de 5,0 a 5,5, e acidez total titulável de 0,096 a 0,12 g de ácido cítrico/100g de matéria fresca (Giovannini et al., 2004). Shiratake & Martinoia (2007) afirmam que o baixo pH de frutos pode ser proveniente de dois processos, bombeamento de prótons para o vacúolo e a síntese e acúmulo de ácidos orgânicos dentro desta organela. As enzimas responsáveis pelo bombeamento de prótons são as H^+ -ATPases. Este bombeamento no vacúolo é feito pelas H^+ -ATPases do tipo V e H^+ -PPases. Foi observado por Azevedo et al. (2007) uma diminuição na acidez total titulável em frutos de mamoeiro com a maturação.

A firmeza da polpa reflete a presença de substâncias pécticas que compõem as paredes celulares. À medida que o fruto amadurece, essas substâncias tornam-se solúveis e ocorre o amolecimento da polpa quando o fruto atinge estádios mais avançados de amadurecimento (Wachowicz e Carvalho, 2002). Segundo Almeida & Huber (1999), as mudanças dinâmicas na parede celular de um fruto em amadurecimento são estreitamente controladas pelo pH local e as condições iônicas. Portanto, a diminuição do pH durante o processo de amadurecimento pode influenciar nas alterações na textura e firmeza da polpa de frutos. Azevedo et al. (2007) confirmaram para frutos de mamoeiro 'Golden' que a firmeza da polpa foi decrescente à medida que os frutos avançaram na maturação, traçaram um paralelo com as altas taxas de emissão do etileno durante o processo de amadurecimento, constatando uma possível influência deste hormônio na atividade das enzimas péctico-hidrolíticas.

A cor é um indicador estético da qualidade de um vegetal, e em muitos casos serve como um índice de maturidade fisiológica, amadurecimento, ou senescência e como um indicador de injúrias fisiológicas, mecânicas ou patológicas. O amadurecimento é um evento que resulta nas maiores mudanças na coloração de frutos destacados (Bartz & Brecht, 2003). Estas mudanças são um resultado direto das alterações no conteúdo de pigmentos, redução no conteúdo de clorofilas e síntese concomitante de carotenóides (Ali & Lazan, 1998). Para mamão, as diferenças entre os estádios de maturação com base na coloração da casca

são avaliadas da seguinte forma: estágio 0 - fruto crescido e desenvolvido (coloração da casca 100% verde); estágio 1 - fruto com até 15% da superfície da casca amarela; estágio 2 - frutos com até 25% da superfície da casca amarela; estágio 3 - frutos com até 50% da superfície da casca amarela; estágio 4 - frutos com 50 a 75% da superfície da casca amarela; estágio 5 - frutos com 100% da superfície da casca amarela (Ritzinger & Souza, 2000).

2.1.4 Aspectos econômicos

O fruto de mamoeiro se caracteriza por uma vida pós-colheita relativamente curta, completando o seu amadurecimento em aproximadamente uma semana sob condições ambientes. No entanto, vários fatores de pré e pós-colheita, como bióticos e abióticos, podem reduzir a sua vida pós-colheita. Esses fatores podem se manifestar nos frutos isoladamente ou em conjunto, proporcionando perdas quantitativas e, ou, qualitativas nas diferentes fases da comercialização (Costa e Balbino, 2002).

Algumas práticas pós-colheita devem ser adotadas para que a vida de prateleira do fruto seja aumentada (Simão, 1998). O uso da termoterapia e do pré-resfriamento, com a aplicação de defensivos e de cera na superfície dos frutos, complementando com acondicionamento adequado em embalagens apropriadas e armazenamento sob refrigeração, são algumas destas. Essas práticas são tanto quanto mais importantes quanto mais distantes e mais exigentes no mercado consumidor (Balbino, 2003).

O Brasil é hoje o maior produtor e o terceiro maior exportador do fruto, e respondendo por cerca de 25% da produção mundial, com 1,6 milhões de toneladas por ano. O mamão é a sétima fruta “in natura” mais exportada no País, sendo cultivado em aproximadamente 30 mil hectares, concentrado nos estados do Espírito Santo e Bahia, que juntos são responsáveis por 70% da produção nacional (SEAG, 2007).

No período de janeiro do ano de 1996, a setembro do ano de 2004 foram exportadas, aproximadamente, 176.607 toneladas de mamão no Brasil. O Estado do Espírito Santo foi o maior exportador, com cerca de

128.178 toneladas (73%), aproximadamente, seguido pelo Estado de São Paulo com 23.015 toneladas (13%), pelo Rio Grande do Norte com 13.880 toneladas (8%), pela Bahia com 9.551 toneladas (5%) e pela Paraíba com 1.983 toneladas, representando, o 1% restante (BRAPEX, 2005).

No Espírito Santo a cultura apresenta os maiores índices de produtividade do país. Ocupa uma área de 12 mil hectares, distribuídos em 11 municípios do Norte do Estado, gerando cerca de 30 mil empregos. O 'Pólo de Linhares' é o mais importante exportador de mamão do Brasil, responsável por 70% da exportação brasileira (SEAG, 2007).

Segundo o IBRAF, as exportações brasileiras de papaia de janeiro a outubro de 2007, somaram um valor de US\$ 27.941.467, totalizando um volume de 26.596.162 Kg de frutos exportados.

2.2 Respiração do fruto

A respiração consiste na decomposição oxidativa de substâncias presentes nas células, como polissacarídeos, açúcares simples, ácidos orgânicos, proteínas e lipídios em moléculas simples CO_2 e H_2O , com produção de energia (Abeles et al., 1992). O processo respiratório fornece além de energia, a formação de esqueletos carbônicos, os quais são necessários para a manutenção e reações de síntese (Kays, 1994). Após a colheita do fruto, a respiração torna-se o seu principal processo fisiológico, pois este não depende mais das substâncias fornecidas pela planta mãe, tendo que utilizar suas próprias reservas de substratos acumulados durante seu crescimento e maturação (Chitarra & Chitarra, 2005).

Os vegetais variam grandemente em sua taxa de respiração. Frutos que são colhidos maduros respiram bem menos do que aqueles colhidos imaturos. Em geral, existe uma relação inversa entre a taxa de respiração e a vida pós-colheita de vegetais frescos. O uso de vários substratos durante o processo de respiração pode resultar na perda de reservas no tecido, perda de qualidade no sabor e no valor do produto para o consumidor (Bartz & Brecht, 2003).

Os frutos são classicamente classificados, do ponto de vista fisiológico, em climatéricos e não climatéricos, em função da presença (climatérico) ou ausência (não-climatérico) do aumento expressivo na

atividade respiratória e síntese etileno na fase do amadurecimento (Lelievre et al., 1997). O período climatérico é uma etapa do desenvolvimento de determinadas espécies vegetais que envolve uma série de mudanças bioquímicas associadas com o aumento natural da respiração e produção auto-catalítica de etileno. Este período consiste de pré-climatérico, pré-climatérico mínimo, aumento climatérico, pico climatérico, e fases pós-climatéricas (Watada, 1984).

Em alguns frutos, o aumento da taxa respiratória caracteriza o estágio de amadurecimento. Neste período ocorrem modificações na textura da polpa e na cor da casca e da polpa. Tais mudanças podem ocorrer durante o pico climatérico ou após, dependendo do fruto (Chitarra & Chitarra, 2005), tornando-o mais palatável.

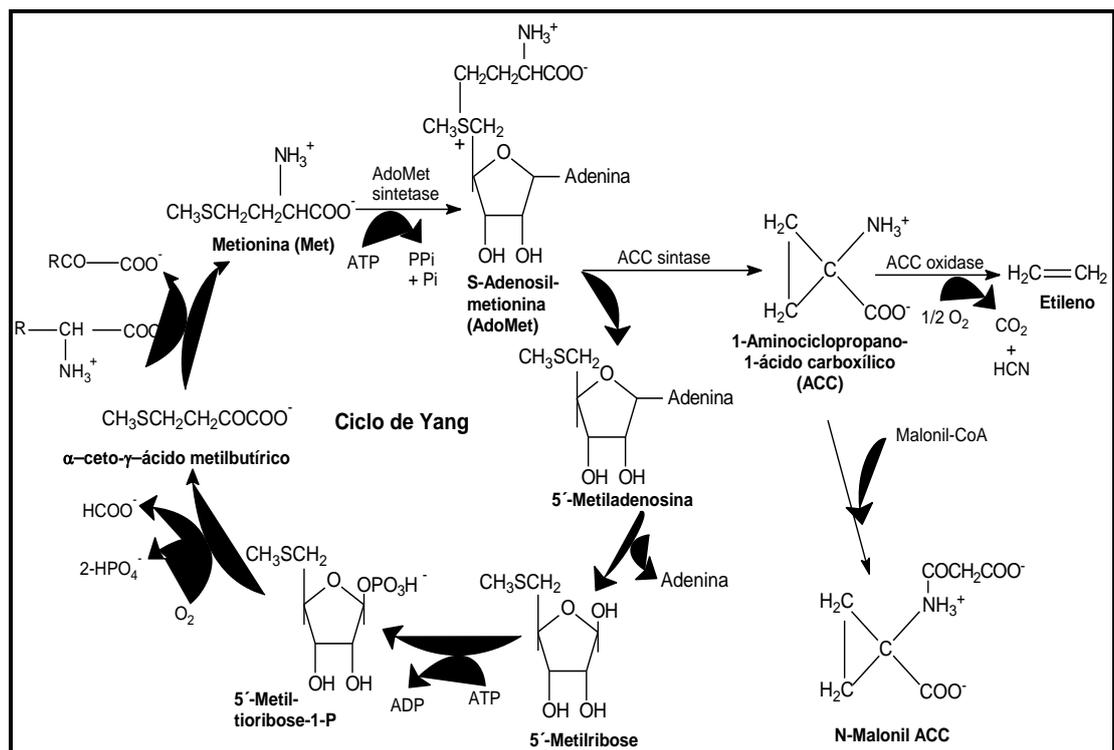
O mamão é considerado um fruto climatérico devido ao seu padrão respiratório. Em mamão, o pico climatérico ocorre simultaneamente com a máxima emissão de etileno (Silva et al., 2001) iniciando a fase do amadurecimento, momento no qual o fruto apresenta melhores atributos de qualidade para consumo (Manica et al., 2006).

2.3 Emissão de Etileno do fruto

O etileno é um hormônio vegetal gasoso, produzido em todas as partes dos vegetais superiores. A taxa de produção de etileno depende do tipo de tecido e do estágio de desenvolvimento deste. A emissão deste fitormônio é expressiva durante a abscisão foliar e a senescência da flor, bem como, durante o amadurecimento dos frutos. O etileno tem sua expressão aumentada por ataque de patógenos, e por danos de origem física ou química (Abeles et al., 1992).

É um fitormônio que modula diversos processos metabólicos envolvidos no amadurecimento de frutos, coordenando a expressão gênica que envolve o aumento da taxa respiratória, a degradação de clorofila e a síntese de carotenóides na casca do fruto, a interconversão de açúcares, o aumento na atividade de enzimas que degradam a parede celular e até mesmo a produção auto-catalítica de etileno (Gray et al., 1992).

A principal via para biossíntese de etileno tem como precursor central o aminoácido metionina, o qual é convertido a S-adenosil metionina (SAM); este por sua vez é convertido a ácido aminociclopropano carboxílico (ACC), que será convertido a etileno. As principais enzimas moduladoras desta rota são a SAM-sintetase, ACC-sintase (ACCS) e ACC-oxidase (ACCO) (Figura 2) (Bleecker & Kende, 2000).



Fonte: Abeles et al., 1992

Figura 2 - Rota de biossíntese do etileno e o ciclo de regeneração da metionina.

O etileno pode exercer regulação por “feedback” positiva ou negativa em sua própria biossíntese, dependendo do tecido, órgão ou estágio de desenvolvimento (Yang, 1985). Com base na resposta à aplicação de etileno exógeno, dois diferentes padrões de produção de etileno têm sido observados (Oetiker & Yang, 1995). Segundo Barry et al. (2000), o sistema I de produção de etileno é encontrado em tecidos vegetativos, frutos não-climatéricos e frutos no estágio do pré-climatério onde a taxa de produção de etileno é baixa e inibida por etileno exógeno. O sistema II do etileno é produzido durante o amadurecimento de frutos climatéricos e senescência

floral onde a taxa de produção de etileno é aumentada e pode ser estimulada por etileno exógeno.

O repentino aumento na produção de etileno na fase do amadurecimento é considerado como um controlador da iniciação das mudanças na cor, aroma, textura, sabor, e outros atributos fisiológicos e bioquímicos. Frutos não-climatéricos são considerados como possuidores de um processo de amadurecimento, independente de etileno (Lelievre et al., 1997).

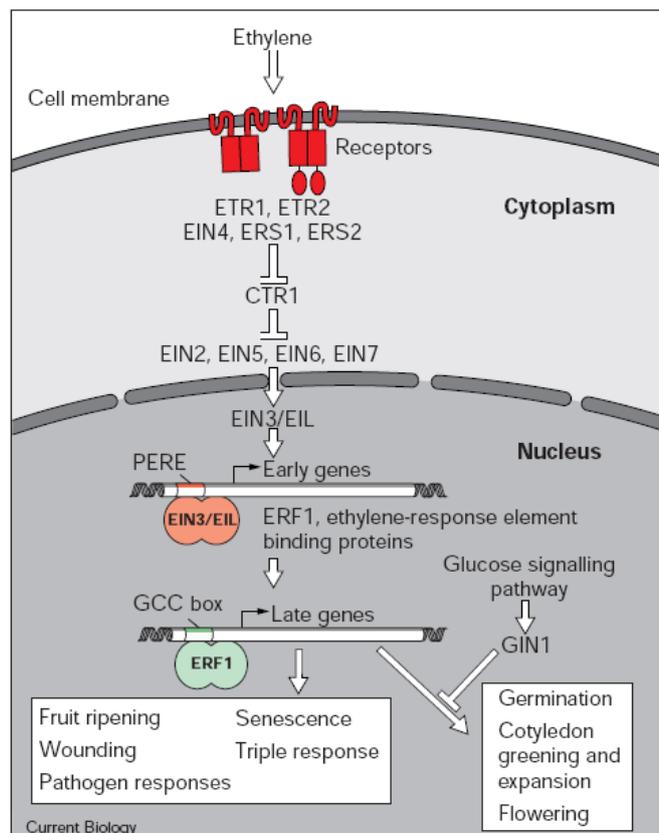
De acordo com Cervantes (2002), os mecanismos para percepção de etileno são bem conservados em plantas, tendo origem anciã. Os receptores do etileno são proteínas de membrana, sendo relacionados a proteínas receptoras encontradas em algas, bactérias e plantas, que possuem sistemas regulatórios, os quais iniciam uma série de reações de fosforilação em respostas a estímulos externos.

O etileno possui diversos inibidores de sua atividade. Os ciclopropenos têm sido descritos como efetivos antagonistas da ação do etileno, os principais são Ciclopropeno (CP), 1-metilciclopropeno (1-MCP) e 3,3-dimetilciclopropeno (3,3-DMCP. Todos esses antagonistas estão na forma gasosa em temperatura ambiente, e não possuem odor forte característico nas concentrações utilizadas para tratamentos em vegetais. O 1-MCP é mais estável que o CP e mais ativo do que o 3,3-DMCP, devido a estas características é preferencialmente utilizado (Sisler e Serek, 1997).

O 1-MCP tem aparecido como uma importante ferramenta no controle da maturação, sendo utilizado para prolongar a vida de prateleira e a qualidade de produtos vegetais, tendo se mostrado como um avanço na agricultura comercial. Este produto também tem se mostrado como um forte aliado na pesquisa, contribuindo com avanços no entendimento da ação do etileno sobre as plantas (Blankenship & Dole, 2002).

A forma de ação deste inibidor é ocupando o sítio receptor do etileno, não permitindo que este se ligue, impedindo desta forma, sua ação. A afinidade do 1-MCP para o receptor do etileno é aproximadamente 10 vezes maior do que o próprio etileno. Desta forma o 1-MCP é ativo em concentrações muito menores do que o etileno (Sisler e Serek, 1997).

Comparativamente ao etileno, o 1-MCP permanece ligado ao receptor por um período de tempo maior, e enquanto estiver ligado, o etileno não poderá se ligar (Sisler e Serek, 1997). O inibidor se liga permanentemente aos receptores, ainda assim as plantas tratadas retornam à sensibilidade ao etileno devido à síntese de novos receptores que permitem a ligação do etileno (Blankenship & Dole, 2002).



Fonte: Athanasios Theologis, 1998.

Figura 3- Via de transdução de sinal do Etileno. “PERE” – Elemento Primário de Resposta ao Etileno.

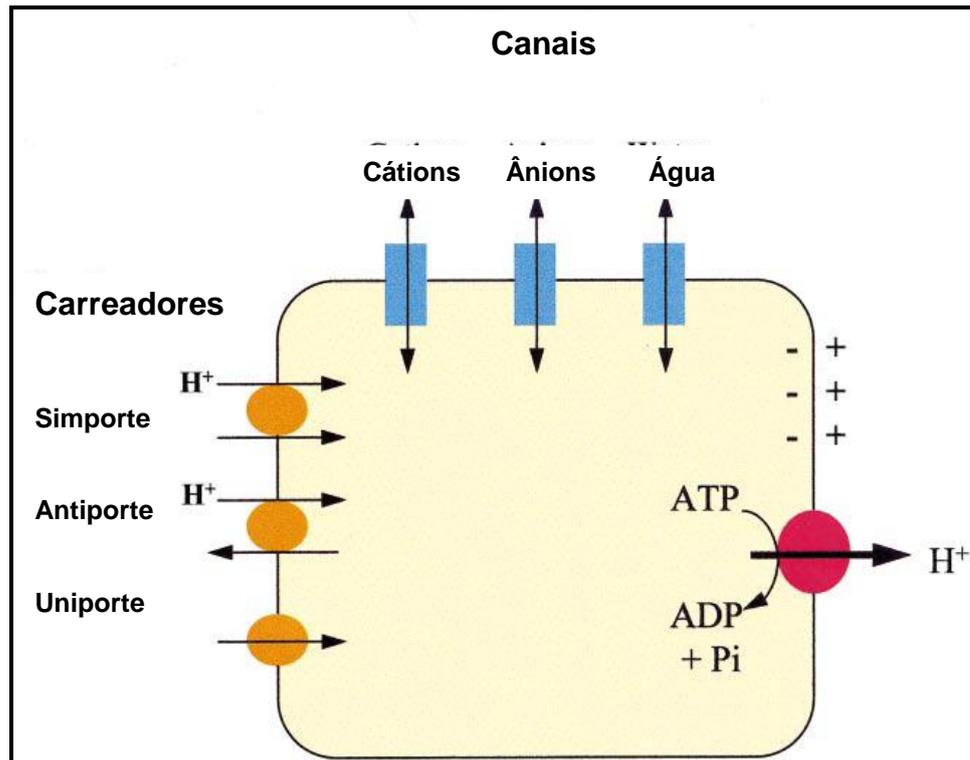
2.4 H⁺- ATPase de membrana plasmática

As membranas biológicas são barreiras seletivas que permitem a manutenção de gradientes iônicos e metabólicos essenciais para o crescimento, desenvolvimento, transporte e transdução de sinal. Elas controlam o fluxo de solutos, íons e metabólitos (Hedrich & Schroeder,

1989). O processo seletivo é desempenhado por complexos protéicos localizados nas membranas, que podem funcionar como proteínas canais, proteínas transportadoras e, como bombas eletrogênicas (Taiz & Zeiger, 2004).

Estes sistemas de transporte, presentes nas membranas biológicas, podem ser classificados em sistemas primários e secundários (Logan et al., 1997). O processo de transporte ativo primário é efetuado pelas bombas eletrogênicas, que se utilizam de compostos ricos em energia para bombear íons através da membrana, gerando um gradiente eletroquímico (Poole, 1978). O transporte de solutos acoplado ao fluxo de prótons através de um mecanismo antiporte/simporte (Figura 3) é chamado de transporte ativo secundário e é efetuado pelas proteínas transportadoras (Serrano, 1989).

Cátions, ânions e solutos neutros podem atravessar a membrana plasmática através de várias proteínas transportadoras. O transporte destes é facilitado pela energização da membrana através do concomitante bombeamento de prótons pela H^+ -ATPase, desta forma a maioria das proteínas transportadoras de membrana identificadas em plantas é energizada indiretamente através da ação das ATPases de membrana plasmática (Palmgren, 2001).



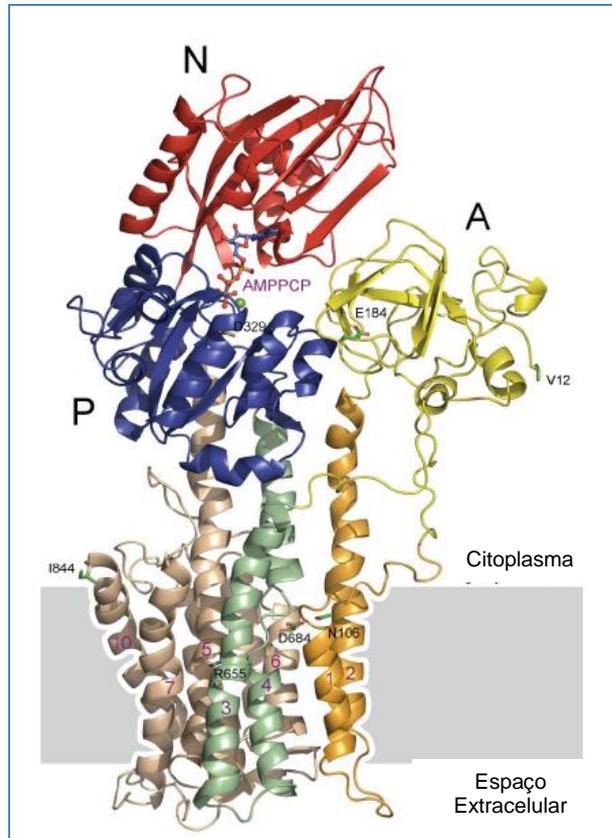
Fonte: Morsomme & Boutry, 2000

Figura 4 – Transporte primário e secundário através da membrana plasmática.

As bombas eletrogênicas são os principais sistemas de transporte de prótons que operam nas células vegetais. Podem ser divididas em bombas da plasmalema H^+ -ATPases do tipo P e Ca^{2+} -ATPases, e as localizadas no tonoplasto H^+ -ATPases do tipo V e as H^+ -PPases (Taiz & Zeiger, 2004). Dentre as bombas eletrogênicas, a H^+ -ATPase do tipo P, será o foco deste trabalho, devido a isto far-se-á uma breve descrição de suas características gerais.

De acordo com Palmgren (2001), as H^+ -ATPases do tipo P diferem marcadamente das outras bombas com respeito a sua bioquímica, organização de subunidades, mecanismo de ação e origem evolucionária. Em plantas, a H^+ -ATPase do tipo P possui uma subunidade catalítica de aproximadamente 100kDa, que durante o ciclo de reação é fosforilada. Seu monômero tem 10 domínios transmembrana (Figura 4) e uma alça hidrofílica contendo a região de ligação do ATP (Briskin & Leonard, 1982; Sze, 1985). Podem formar complexos de heterosubunidades como Na^+/K^+ -ATPase e H^+/K^+ -ATPase, as quais são compostas da subunidade catalítica K e da subunidade glicosilada L, ou compreendem uma única subunidade como as

Ca²⁺- ATPases e as H⁺ ATPase de membrana plasmática de plantas e fungos (Morsomme & Boutry, 2000).



Fonte: Pederson et al., 2007

Figura 5 - Modelo estrutural da H⁺-ATPase da membrana plasmática

A H⁺ - ATPase presente na membrana plasmática das plantas desempenha a função de transportar íons e moléculas por meio de transporte ativo, através de um gradiente eletroquímico. Esta bomba utiliza ATP como substrato para bombear prótons através da membrana plasmática para o apoplasto, produzindo um gradiente de pH e um potencial elétrico através da membrana. A atividade desta bomba de prótons está relacionada a diferentes eventos fisiológicos, dentre eles estão a quebra de dormência em sementes; o desenvolvimento de polaridade em células de tecidos em crescimento; carregamento de nutrientes e turgor celular; crescimento celular; acidificação e alcalinização de meios, com posterior ativação de enzimas, dentre outros (Serrano, 1989).

A H^+ - ATPase do tipo P pode ser encontrada em todos os tipos de células vegetais, em diferentes quantidades de acordo com o tecido. Em geral, os tecidos especializados para intensa atividade de transporte ativo e acúmulo de solutos são os mais abundantes nesta bomba. O floema, um tecido especializado para transporte de longa distância de uma grande parte de componentes orgânicos, contém grande concentração de H^+ - ATPases do tipo P (Palmgren, 2001). Zhao et al. (2000) verificaram que a H^+ - ATPase do tipo P é importante para o carregamento de sacarose e outros fotoassimilados no floema.

A H^+ - ATPase de membrana plasmática é inibida por ortovanadato (Gallagher et al, 1982) e por complexos de fluoreto de alumínio (Façanha e De Meis, 1995). Pode ser regulada pela concentração de seu substrato (ATP), pH e temperatura (Sze et al., 1999), tem sua atividade basal estimulada por cátions alcali como K^+ , NH_4^+ . Os ânions não têm atividade aparente sobre a hidrólise de ATP, no entanto cátions divalentes como Mg^{2+} ou Mn^{2+} são requeridos para sua atividade (Gallagher et al., 1982). Esta enzima pode ser ativada ou desativada em resposta à luz, aos hormônios, ataque de patógenos, dentre outros (Dietz et al., 2001).

Praticamente todos os hormônios de plantas interagem com a bomba de prótons de membrana plasmática. A auxina ativa a enzima em células em crescimento, promovendo a alongação celular (Brummel & Hall, 1987). Peng et al. (2003) verificaram que o ácido abscísico ativou fortemente a H^+ -ATPase do tipo P em frutos de maçã. Foi visto para frutos de mamoeiro, que o pico de etileno parece sinalizar para uma diminuição na atividade da enzima (Azevedo et al., 2008). Heyes et al. (1997) verificaram que a bomba de prótons de membrana plasmática tinha sua atividade diminuída durante o início do amadurecimento e com posterior aumento na fase final, até a senescência, em pepino, sugerindo que esta bomba de prótons contribui para o amolecimento destes frutos através da diminuição do pH apoplástico. Domingos & Ruber (1998) também relatam variações no pH do apoplasto para frutos de tomateiro durante o processo de amadurecimento, eles sugerem que a diminuição no pH do apoplasto seja responsável pela degradação de polímeros e ativação de hidrólises alterando a textura do fruto.

As bombas de prótons têm sido relatadas por estarem envolvidas em diversos processos no amadurecimento de frutos. Afetando o transporte de açúcares e ácidos durante o amadurecimento de uva, a homeostase do pH e o transporte de solutos em células vegetais (Robinson & Davies, 2000; Zandonadi et al., 2007). Milner et al. (1995) verificaram um aumento na atividade das bombas de prótons de tonoplasto no início da maturidade de tomate. Este aumento foi seguido por uma redução na atividade destas enzimas. Já para frutos não climatéricos como uva, morango e maçã, a atividade das bombas de prótons parece aumentar com o processo de amadurecimento destes frutos (Terrier et al., 2001; Ben-Arie & Faust, 1980; Lurie et al. , 1983).

As especulações acerca da atividade destas bombas durante o processo de maturação são inúmeras, vão desde a modulação por diversos hormônios até a ativação de enzimas e transporte de solutos. O trabalho efetuado por Azevedo et al. (2007) fornece evidências da participação da H⁺-ATPase do tipo P no processo de amadurecimento de frutos de mamoeiro e a possível modulação da atividade desta enzima pelo hormônio etileno durante o processo de amadurecimento. O processo de amadurecimento de frutos é uma importante etapa do desenvolvimento a ser investigado, seu balanço hormonal, como são orquestrados os sistemas de transporte, as atividades enzimáticas e como ocorre a interconexão entre estes diferentes elementos. A elucidação de mais uma etapa destes processos bioquímicos e fisiológicos do fruto faz-se necessária para que ocorra um melhor entendimento sobre o amadurecimento e a fisiologia dos frutos após a colheita.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a relação entre a atividade da enzima H^+ -ATPase de membrana plasmática e a emissão de etileno durante o processo de amadurecimento em frutos de mamoeiro cultivar Golden.

3.2 Objetivos específicos

- Estimar a emissão de etileno e a atividade da H^+ -ATPase de membrana plasmática em frutos de mamoeiro 'Golden', sob três tratamentos diferentes;
- Relacionar as alterações ocorridas na atividade enzimática da bomba de prótons de membrana plasmática com a emissão de etileno durante o processo de amadurecimento e em situações de promoção e inibição da produção de etileno;
- Caracterizar atributos físico-químicos como firmeza, coloração, teor de sólidos solúveis e acidez dos frutos de mamoeiro 'Golden' durante o processo de amadurecimento e em situações de promoção e inibição da produção de etileno.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido seguindo um Delineamento Inteiramente Casualizado em esquema fatorial (dias de tratamento X tratamento), com três repetições. Os resultados foram interpretados estatisticamente por meio de análises de variância, e teste de médias. Os resultados foram analisados através do programa Genes (Cruz, 2006).

4.2 Material Vegetal

Os frutos de mamoeiro 'Golden' foram obtidos de lavouras da região de Linhares, ES (latitude 19°15' S, longitude 39°51' O), apresentando temperaturas máximas entre 30°C - 32°C e mínimas entre 15°C - 18°C (INCAPER-ES). Os frutos foram acondicionados em caixas de papelão para exportação e transportados sob refrigeração (15 °C) até o Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal onde se realizaram os ensaios.

4.3 Aplicação dos tratamentos

Os tratamentos foram constituídos de amadurecimento natural, indução do amadurecimento e inibição do amadurecimento dos frutos. Em

todos os tratamentos os frutos foram mantidos em condições de temperatura e umidade relativa controladas ($24 \pm 1^\circ\text{C}$ e $85 \pm 5\%$).

4.3.1 Amadurecimento natural dos frutos:

Os frutos submetidos a este tratamento foram colhidos no estágio 0 de maturação (quando o fruto tem a casca 100% verde, mas já atingiu a maturidade fisiológica) e deixados amadurecer naturalmente em ambiente controlado ($24 \pm 1^\circ\text{C}$ e $85 \pm 5\%$).

As amostras foram constituídas de no mínimo 15 frutos em diferentes dias de armazenamento (0, 1, 3, 4, 5 e 6 dias). Os frutos de cada dia foram avaliados quanto à emissão de gases (etileno e CO_2) de forma não-destrutiva e posteriormente submetidos às análises químicas e físicas de confirmação do estágio de maturação, além das avaliações quanto à atividade da H^+ -ATPase, as quais foram realizadas de forma destrutiva. Para cada dia de avaliação foram analisados três frutos, cada fruto representando uma repetição.

4.3.2 Indução do Amadurecimento

Os frutos submetidos a este tratamento foram colhidos no estágio 0 de maturação e expostos a uma concentração de 1ppm de etileno exógeno com fluxo constante de 1L/h durante 24 h, em caixa lacrada (fig. 6), para indução de seu amadurecimento, e armazenados sob condições controladas ($24 \pm 1^\circ\text{C}$ e $85 \pm 5\%$). Os frutos controle foram acondicionados nas mesmas condições, só que foram expostos a um fluxo contínuo de ar pelo mesmo período.

As amostras foram constituídas de no mínimo 30 frutos em diferentes dias de armazenamento. Em intervalos de um dia, três frutos (cada fruto representando uma repetição) foram avaliados quanto à emissão de gases (etileno e CO_2) de forma não-destrutiva e posteriormente submetidos a análises químicas e físicas de confirmação do estágio de maturação, além das avaliações quanto à atividade da H^+ -ATPase, as quais foram realizadas de forma destrutiva.



Figura 6 – Montagem experimental usada para a submissão dos frutos à exposição de etileno exógeno.

4.3.3 Inibição do amadurecimento

Os frutos submetidos a este tratamento foram colhidos no estágio 0 de maturação e tratados com 1-metilciclopropeno (1-MCP, *SmartFresh™*, Rohm and Haas Química Ltda.) na concentração de 50nL/L (Souza, 2008) por 12h em caixa lacrada, para inibição de seu amadurecimento. Posteriormente os frutos foram armazenados sob condições controladas ($24 \pm 1^\circ\text{C}$ e $85 \pm 5\%$).

As amostras foram constituídas de no mínimo 30 frutos em diferentes dias de armazenamento. Em intervalos de dois dias, três frutos (cada fruto representando uma repetição) foram avaliados quanto à emissão de gases (etileno e CO_2) de forma não-destrutiva e posteriormente submetidos a análises químicas e físicas de confirmação do estágio de maturação, além das avaliações quanto à atividade da H^+ -ATPase, as quais foram realizadas de forma destrutiva.

4.4 Análises gasosas

Foram feitas análises da emissão de etileno (C_2H_4) e CO_2 pelo fruto. Estes ensaios foram efetuados no Laboratório de Ciências Físicas, situado no Centro de Ciência e Tecnologia (CCT), da UENF.

4.4.1 Medida da emissão de etileno

Para a determinação da emissão de etileno nos frutos de mamoeiro foi utilizado um espectrômetro fotoacústico produzido pela Universidade Católica de Nijmegen (Holanda), utilizado especificamente para aplicações biológicas (Silva et al., 2001).

Esse equipamento é capaz de medir concentrações da ordem de partes por bilhão (ppb), apresentando a vantagem de medir em tempo real a taxa de emissão de etileno da fruta, não havendo a necessidade de acúmulo do gás.

Os frutos foram colocados individualmente, à temperatura ambiente, em um recipiente de volume igual a 1L. Os gases emitidos pelo fruto são arrastados (gás de arraste), passando por filtros para retirar qualquer resíduo gasoso que possa interferir na medida, indo até o equipamento.

Com os valores de fluxo, massa dos frutos e concentração do gás analisado, a taxa de emissão de etileno foi calculada. Os resultados médios foram expressos em $ng.Kg^{-1}.h^{-1}$.

4.4.2 Medida da respiração

A medida da respiração foi feita pela quantificação da produção de CO_2 , utilizando-se um analisador comercial de gás no infravermelho modelo (Hartman & Braun modelo URAS14). Este equipamento mede em tempo real a taxa de emissão de dióxido de carbono (CO_2), e permite que baixas concentrações de CO_2 provenientes da respiração da amostra sejam detectadas com uma precisão de aproximadamente 0,1% (v/v).

Da mesma maneira que no etileno, com os valores de fluxo, massa dos frutos e concentração do gás analisado, a produção de CO_2 foi calculada.

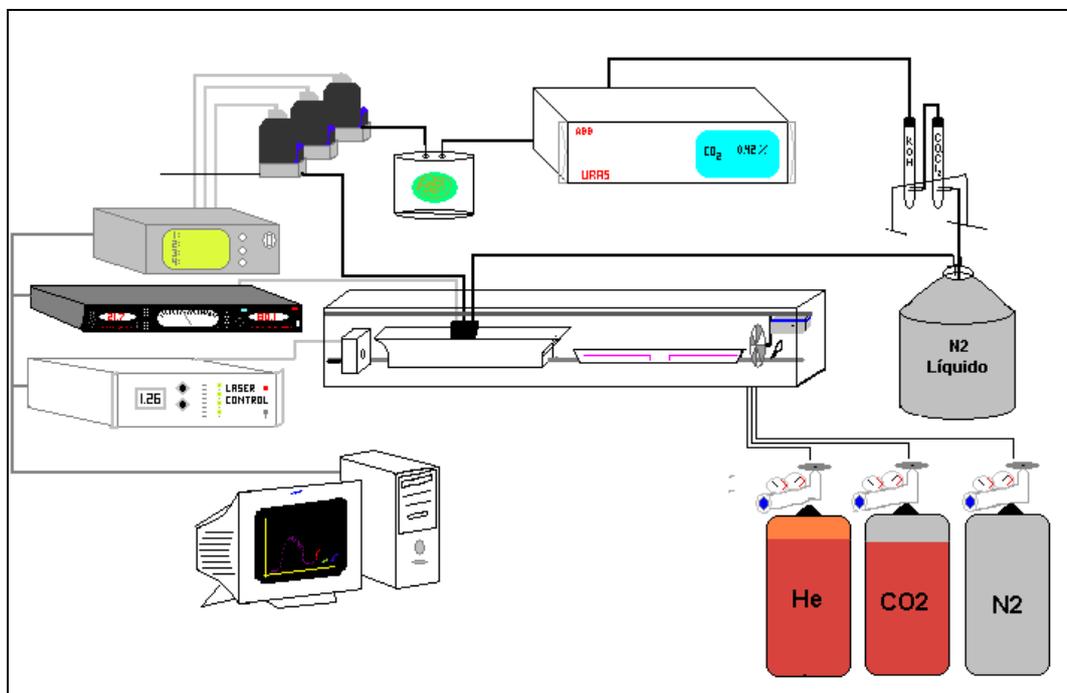


Figura 7 – Montagem experimental usada para monitorar a emissão de etileno e CO_2 .

4.5 Estádio de desenvolvimento dos frutos

Para caracterizar o estágio de maturação em que o fruto se encontra foram avaliados os parâmetros coloração da casca, firmeza da polpa, teor de sólidos solúveis e acidez total titulável, além da avaliação das taxas de emissão de etileno e atividade respiratória.

4.5.1 Determinação da coloração da casca

Os frutos foram avaliados quanto à sua cor utilizando um colorímetro de refletância (Minolta Co., Osaka, Japan), que fornece parâmetros de cor definidos por três coordenadas (X, Y e Z) e o ângulo de cor. Assim, foram analisados os parâmetros de cor de Hunter L^* , a^* e b^* . Onde L^* varia de preto a branco, a^* alcança de verde (valores negativos) a vermelho (valores positivos) e b^* de azul (valores negativos) a amarelo (valores positivos)

(Vendramini & Trugo, 2000). O ângulo "hue" ($^{\circ}h$) quando apresenta valores próximos de 90° indica que a coloração da casca do fruto encontra-se amarelada, ângulo próximo de 180° é indicativo de coloração verde (McGuire, 1992). Foram coletadas leituras randômicas em três pontos equidistantes no eixo equatorial da superfície de cada fruto, nos diferentes estádios de maturação.

4.5.2 Determinação da firmeza da polpa

Para avaliação desta característica foi utilizado um penetrômetro de bancada (modelo 53205; Fruit Pressure Tester, Italy) com adaptador de 8,0 x 8,0 mm (altura x diâmetro). Cada fruto foi dividido ao meio, longitudinalmente. A firmeza foi determinada por meio da resistência à penetração na polpa em três pontos equidistantes de cada face dos frutos, sendo estes distantes da casca em 0,5 cm. Os valores obtidos foram expressos em Newton (N).

4.5.3 Determinação do teor de sólidos solúveis

A análise do teor de sólidos solúveis totais contidos na polpa do mamão foi determinada através da avaliação de gotas de suco do fruto obtidas de uma amostra da polpa, postas sobre o prisma do refratômetro (SAMMAR), sendo os resultados expressos em $^{\circ}$ Brix.

4.5.4 Determinação da acidez total titulável

O método N $^{\circ}$ 22.058 descrito pela A.O.A.C. (1970) com concentração de álcali de 0,1N de NaOH, foi empregado para análise da acidez total titulável da polpa dos frutos. As amostras foram constituídas de aproximadamente 30 g de tecido da polpa, retiradas da região mediana dos frutos, homogeneizado em 50 mL de água destilada. A titulação se procedeu com solução padronizada de NaOH 0,1N. Os resultados foram expressos em percentagem de ácido cítrico, obtidos através da seguinte expressão matemática.

$$\text{ATT (\% em ácido cítrico)} = \frac{\text{volume de NaOH (mL)} \times \text{N do NaOH} \times \text{grama do ácido cítrico} \times f}{\text{Massa da amostra (g)}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que:

N = normalidade da base;

Equivalente grama do ácido cítrico = 64;

f = fator de correção da base

4.6 Atividade de H⁺-ATPase do tipo P

4.6.1 Obtenção das vesículas

As vesículas microssomais contendo H⁺-ATPases, foram isoladas a partir da polpa de frutos de mamoeiro. Obtidas através do processo de centrifugação diferencial, com devidas adaptações, o qual foi descrito por Giannini & Briskin (1987). As adaptações no protocolo foram feitas por Azevedo et al. (2007) a partir das dificuldades encontradas para a extração em mamão, os quais são frutos com altas concentrações de água que dificultava a concentração das proteínas. Devido a isto se utilizou um tampão de extração bem mais concentrado.

Azevedo et al. (2008) encontraram dificuldades na obtenção das vesículas seladas em frutos em estádios iniciais de maturação, devido às altas concentrações de látex nestes frutos. O látex possui grande quantidade de enzimas proteolíticas, lipolíticas e mucolíticas, o que inviabiliza as vesículas extraídas. Devido a estas dificuldades encontradas, adicionou-se ao tampão do presente experimento a enzima antipáina que degrada o látex e um protetor de lipases lisofosfatidiletanolamina, para viabilizar a extração de vesículas em frutos verdes.

As amostras de tecido da polpa foram pesadas, homogeneizadas em tampão de extração, na proporção de 1:1 (m/v). O processo de homogeneização foi efetuado em um mixer, sendo todo o procedimento conduzido sob banho de gelo.

O tampão de extração utilizado foi constituído de, 700 mM Sacarose, 30% (v/v) Glicerol, 210 mM tampão Tris pH 8,0, 300 mM KCl e 15 mM EDTA, 2 mM PMSF, 10 mM DTT, 0,3% BSA (p/v) , 0,4% PVPP (p/v). A

amostra obtida foi filtrada em 4 camadas de gaze. A primeira centrifugação foi efetuada em centrífuga HITACHI, Himac CP a 1.500 x g por 15 min, para remover células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi coletado e submetido a uma nova centrifugação a 8000 x rpm por 15 min (centrífuga HITACHI, Himac CP) para remoção de mitocôndrias. O sobrenadante obtido foi centrifugado a 100.000 x g por 45 min. A enzima antipaína foi adicionada ao tampão de suspensão. O material precipitado foi suspenso em solução tampão contendo: glicerol 10%, MOPS-Tris 100 mM, EGTA 5mM, MgSO₄ 6mM, PMSF 2mM e DTT 1 mM, 1µM lisofosfatidiletanolamina, antipaína, pH 7,5 sendo composto das vesículas de plasmalema.

4.6.2 Determinação de proteínas totais

O conteúdo de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976), em espectrofotômetro SHIMADZU UV-120 a 595 nm, usando como proteína padrão BSA (Bovine Serum Albumine).

4.6.3 Atividade hidrolítica da H⁺- ATPase do tipo P

As vesículas de plasmalema obtidas no processo foram submetidas à análise de sua atividade hidrolítica. Esta foi determinada pelo método descrito por Fiske & Subbarow (1925), que consiste na dosagem colorimétrica de fosfato inorgânico (P_i) liberado durante a hidrólise enzimática de ATP. A reação foi iniciada com a adição de material amostral (vesículas) ao meio de reação, sendo interrompida através da adição de ácido tricloroacético (TCA) em uma concentração final de 20%. As amostras obtidas foram analisadas em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-120) em comprimento de onda de 750 nm. O meio de reação é constituído de: 50 mM MOPS-Tris pH 6,5; 3 mM MgSO₄, 100 mM KCl, 1 mM ATP, 10 mM Molibdato de Sódio e 0,03 mg.mL⁻¹ de proteína.

A hidrólise de ATP foi determinada através da atividade sensível ao inibidor específico, neste caso 0,2 mM de ortovanadato de sódio. Da seguinte forma: atividade total subtraída da atividade inibida.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do amadurecimento dos frutos

Os frutos foram armazenados de forma que pudessem amadurecer sob condições do ambiente sendo avaliados quanto a diferentes características físico-químicas. Segundo Salveit (1999), o acompanhamento da taxa de emissão do etileno é essencial para a definição do climatério. Os resultados mostram que a emissão de etileno e CO₂ durante o amadurecimento dos frutos apresentou um pico no quinto e no quarto dia de armazenamento, respectivamente (Figuras 8 e 9). Estes dados mostram uma defasagem de um dia entre a emissão máxima de etileno e o pico respiratório, contrário ao que diz Chitarra & Chitarra (2005), que afirmam que o aumento na respiração seria um evento conseqüente ao aumento do etileno. Tal diferença de resposta não é novidade, uma vez que este é um assunto ainda controverso, com muito a pesquisar-se até conhecer a verdadeira interdependência entre estes dois eventos. Segundo Rhodes (1970), o climatério pode ser definido como o período do desenvolvimento de alguns frutos, chamados de climatéricos, onde ocorrem diversas alterações bioquímicas moduladas pelo aumento na emissão do etileno, que provocam a transição do estado de maturação dos frutos para o de senescência, também é característico desta fase o aumento da taxa de respiração.

A caracterização do estágio de desenvolvimento de um fruto pode ser feita através da observação de diversos fatores físicos, químicos e

bioquímicos. A avaliação da coloração da casca do fruto é uma das formas mais utilizadas de diferenciação entre as fases de maturação e amadurecimento. Neste trabalho foi observado que a maior mudança na coloração dos frutos, indicada pela queda no ângulo *hue*, ocorreu entre o 1º e o 4º dia de armazenamento (Figura 10), coincidindo com o início da ascensão climatérica (tanto para a emissão de CO₂, quanto de C₂H₄). O ângulo *hue* é uma variável angular que indica a coloração da amostra, valores próximos de 90º representam a cor amarela, enquanto o ângulo próximo de 180º é indicativo de coloração verde (McGuire, 1992).

A firmeza da polpa do fruto é um atributo qualitativo de suma importância na pós-colheita (Chitarra & Chitarra, 2005). Na Figura 11 observa-se que a firmeza do fruto caiu de maneira expressiva a partir do 3º dia de armazenamento, mantendo-se constante até o final do período de observação.

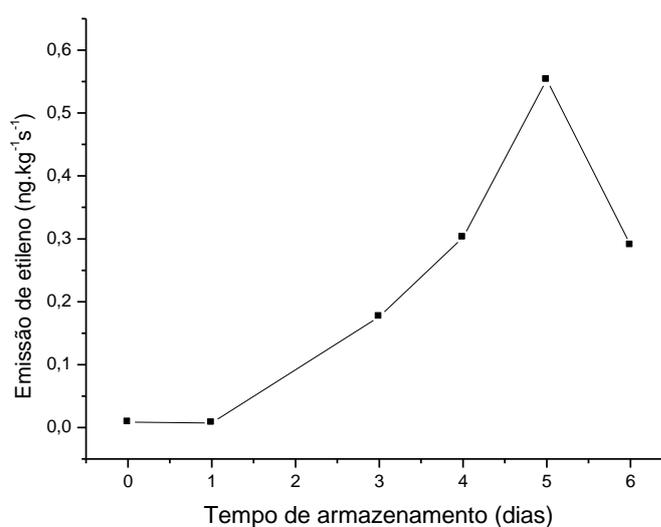


Figura 8 – Taxa de emissão de etileno em frutos de mamoeiro ‘Golden’, em função do tempo de armazenamento. Os dados são apresentados como uma média de 3 repetições.

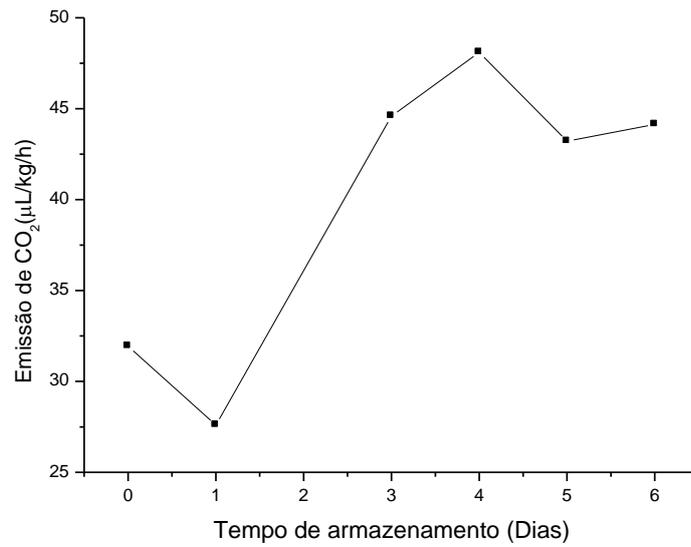


Figura 9 – Taxa de emissão de CO₂ em frutos de mamoeiro 'Golden', em função do tempo de armazenamento. Os dados são apresentados como uma média de 3 repetições.

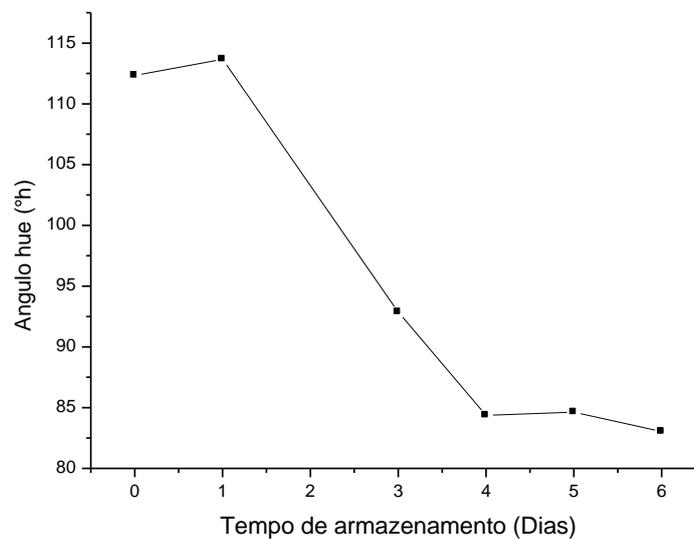


Figura 10 – Evolução temporal da variação do ângulo Hue durante o amadurecimento natural de frutos de mamoeiro 'Golden'. Valores de "hue" (°h) próximos de 90° indicam coloração amarelada, ângulo próximo de 180° é indicativo de coloração verde.

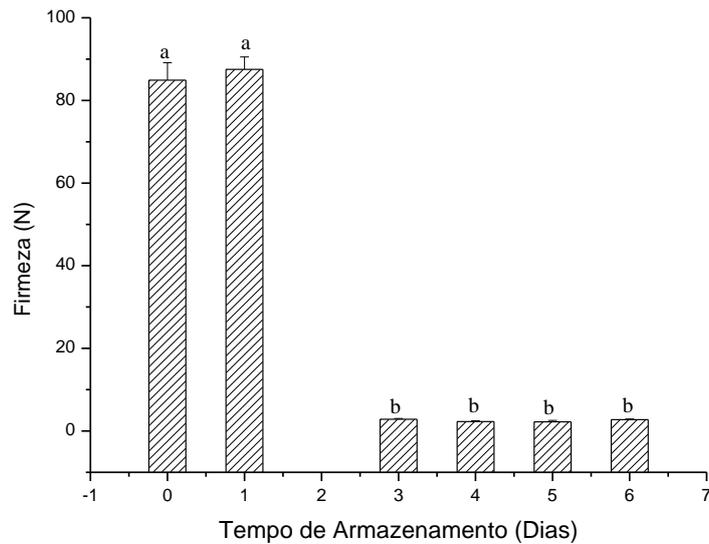


Figura 11 - Avaliação da firmeza da polpa em frutos de mamoeiro em função do tempo de armazenamento. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5%.

A textura é considerada um dos principais atributos de qualidade, responsáveis pela aceitabilidade do fruto pelo consumidor (Tucker, 1996) e a firmeza está ligada diretamente a este atributo. A perda de firmeza do fruto tem sido freqüentemente atribuída ao aumento na emissão de etileno. O etileno é o hormônio responsável pelo desencadeamento do processo de maturação, e conseqüentemente com os eventos a ele associados, dentre os quais as mudanças na textura (Abeles *et al.*, 1992). A ação de enzimas pectino-hidrolíticas, que degradam componentes da parede célula, provoca o amaciamento da polpa do mamão durante o amadurecimento. A atividade dessas enzimas aumenta no mamão durante o amadurecimento (Chan Jr., 1986). O amolecimento da polpa dos frutos é provocado, dentre outros processos, pela degradação da lamela média da parede celular, resultando no afrouxamento da união célula-célula (Smith *et al.*, 2003).

O teor de sólidos solúveis (TSS) é um indicador da quantidade de açúcares solúveis contidos na polpa do fruto. Os resultados encontrados para esta característica corroboram com o encontrado por Azevedo *et al.* (2008), onde esta variável não se altera significativamente durante o período de amadurecimento do mamão 'Golden'. Os valores encontrados ficaram em

torno de 9,9 ° Brix (Figura 12). A constância no TSS durante o período de amadurecimento do mamão já é esperada como verificado por Paull (1996) e Gomes et al. (2002), que afirmam que estes frutos não acumulam amido durante seu desenvolvimento, não permitindo, assim, grandes variações no conteúdo de açúcares solúveis durante o processo de amadurecimento.

A acidez titulável (AT) não variou durante o período observado, seus valores médios ficaram entre 0,11 e 0,08% de ácido cítrico (Figura 13). Este resultado foi diferente do encontrado por Azevedo et al. (2008), onde a AT da polpa do mamão diminuiu coincidentemente com o pico de etileno. No entanto, os valores de AT encontrados neste trabalho ficaram dentro do esperado para mamão, abaixo de 0,3% de ácido cítrico segundo Martins e Costa (2003). Os valores da AT têm sido descritos como bem variáveis durante o amadurecimento de frutos. Os ácidos orgânicos tendem a diminuir durante o amadurecimento dos frutos devido à sua conversão em açúcares ou pelo processo respiratório, podendo variar de acordo com a espécie e cultivar (Souza, 1998).

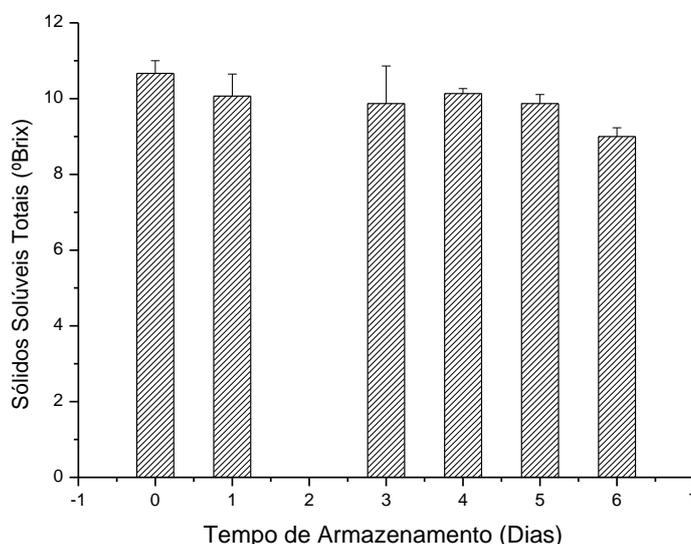


Figura 12 - Teor de sólidos solúveis totais em frutos de mamoeiro 'Golden', em função do tempo de armazenamento. Teste de análise de variância não significativo.

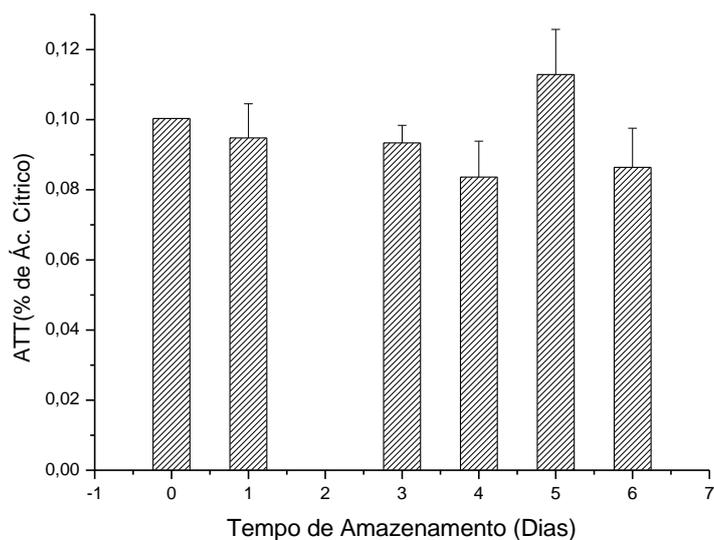


Figura 13- Acidez Total Titulável (ATT) em frutos de mamoeiro 'Golden', em frutos amadurecidos naturalmente, em função do tempo de armazenamento. Teste de variância não significativo.

A avaliação da atividade de hidrólise da ATPase do tipo P mostrou um perfil no qual a atividade foi decrescente desde o início do armazenamento até o quarto dia, quando registrou seu menor valor, elevando-se a seguir e mantendo-se estável até o final das avaliações no sexto dia (Figura 14). O perfil apresentado sugere que a atividade da bomba de prótons diminui a partir do momento em que o fruto inicia a subida para o climatério e conseqüentemente as taxas de respiração e emissão de etileno aumentam. Este resultado corrobora com o encontrado por Azevedo *et al.* (2008), que verificaram que a atividade ATPásica da bomba de prótons do tipo P diminuía concomitantemente com o aumento na emissão de etileno durante o período climatério.

Os resultados sugerem que há uma diminuição no aporte energético da plasmalema durante o período do climatério, verificado pela diminuição na atividade da bomba de prótons do tipo P. As bombas de prótons geram um gradiente eletroquímico responsável pela energização dos principais sistemas de transporte secundários das células vegetais (Morssomme & Boutry, 2000). Com a redução da atividade desta bomba de prótons (ATPase do tipo P) há uma diminuição no transporte de substâncias através

da membrana neste período. Como a diminuição na atividade desta enzima parece ser coincidente com o aumento na emissão do etileno, como verificado por Azevedo *et al.* (2008) e aqui neste trabalho, pode-se sugerir que há um controle na atividade desta enzima pelo etileno. Há fortes indícios, portanto, que o etileno possa estar atuando como um modulador no transporte de solutos através da membrana durante o período do climatério. Existem poucos trabalhos associando o processo de amadurecimento com a atividade da bomba de prótons. Foi relatado para pepino, que a atividade diminuía no início do amadurecimento e aumentava na fase final deste processo (Heyes *et al.*, 1997). No entanto, a associação da emissão do etileno com a atividade da H⁺-ATPase do tipo P só foi verificada, em 2008, por Azevedo *et al.*, tendo continuidade neste trabalho.

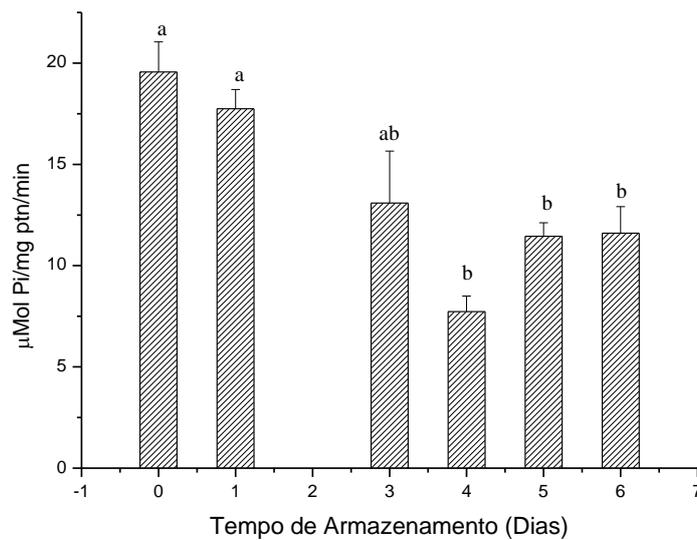


Figura 14 - Atividade ATPásica, vanadato sensível, em membrana plasmática de tecido de polpa de frutos de mamoeiro 'Golden', em função do tempo de armazenamento dos frutos. Os dados são apresentados como uma média de 3 repetições, a significância entre os dias foi determinada por análise de variância seguida do teste Tukey a 5%.

5.1 Indução do Amadurecimento dos Frutos

Os frutos induzidos ao amadurecimento apresentaram pico de emissão de etileno logo no primeiro dia, com antecipação de quatro dias em relação aos frutos controle, que emitiram o pico de etileno no quinto dia de armazenamento (Figura 15). Além da antecipação na ocorrência do pico, a taxa máxima de emissão de etileno dos frutos tratados foi duas vezes maior que aquela dos frutos não expostos ao etileno exógeno.

A taxa respiratória dos frutos tratados com etileno também foi diferente em relação ao tratamento controle. Observa-se uma maior emissão de CO₂ nos frutos tratados com etileno durante todo o período de avaliação, com maior diferença (cerca de duas vezes) nos dois primeiros dias de armazenamento (Figura 16). Os frutos controle mantiveram sua taxa respiratória baixa até o quarto dia de armazenamento (Figura 16), quando houve um aumento nesta taxa, coincidente com o início do aumento na emissão de etileno.

Os resultados mostram que os frutos submetidos ao etileno exógeno anteciparam o período climatérico e aumentaram a atividade respiratória, antecipando, dessa forma, o seu amadurecimento, com relação aos frutos sem o tratamento com etileno. O aumento na produção de etileno e a antecipação do pico deste nos frutos expostos ao etileno exógeno é possível devido à característica deste hormônio de induzir sua produção autocatalítica nos frutos climatéricos (McMurchie *et al.*, 1972). Nestes frutos o etileno modula a atividade de enzimas de sua via de biossíntese, o que leva ao aumento na sua produção durante o amadurecimento dos frutos (Yang, 1985). Goiabas da variedade 'Beaumont' colhidas verdes tiveram seu processo de amadurecimento antecipado quando expostas a etileno exógeno (Reyes & Paull, 1995). O mesmo foi verificado para Bananas expostas a concentrações crescentes de etileno, que tiveram aumento na coloração, perda de massa, e menor tempo de prateleira devido à aceleração do amadurecimento dos frutos (Álvares, V. S., 2003).

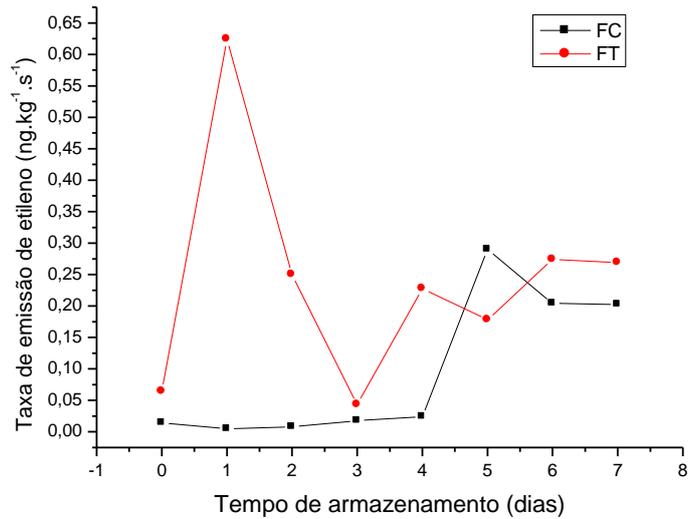


Figura 15 – Taxa de emissão de etileno em frutos de mamoeiro ‘Golden’, sob amadurecimento natural (FC, frutos controle) e em frutos submetidos à exposição de 1ppm de etileno por 24h (FT, frutos tratados) em função do tempo de armazenamento. Os dados são apresentados como uma média de 3 repetições.

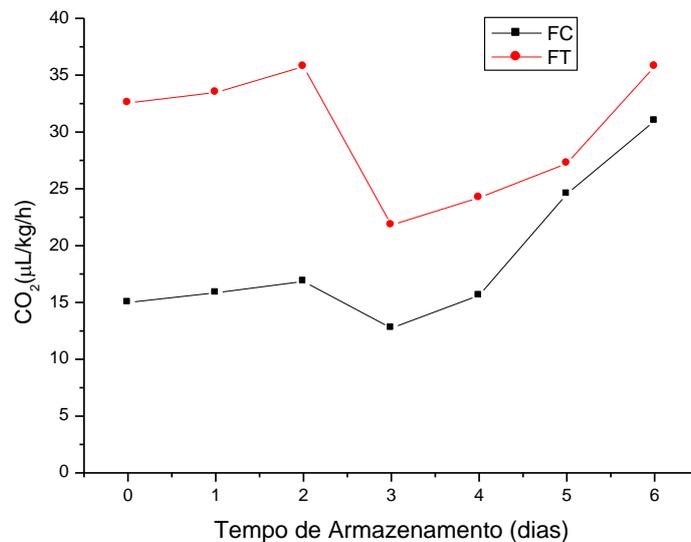


Figura 16 – Taxa de emissão de CO₂ em frutos de mamoeiro ‘Golden’, sob amadurecimento natural (FC, frutos controle) e em frutos submetidos à exposição de 1ppm de etileno por 24h (FT, frutos tratados) em função do tempo de armazenamento. Os dados são apresentados como uma média de 3 repetições.

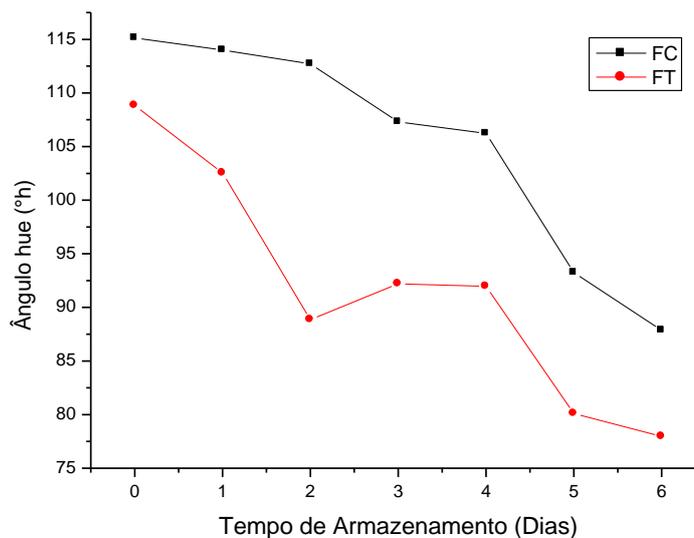


Figura 17 – Evolução temporal da variação do ângulo “hue” durante a indução do amadurecimento de frutos de mamoeiro ‘Golden’. Valores de “hue” ($^{\circ}h$) próximos de 90° indicam coloração amarelada, ângulo próximo de 180° é indicativo de coloração verde.

A mudança na cor dos frutos expostos ao etileno exógeno do verde para o amarelo aconteceu no segundo dia de armazenamento (Figura 17), coincidente com a máxima taxa respiratória dos frutos e posterior à emissão do pico de etileno. Já nos frutos controle a maior mudança na coloração ocorreu entre o quarto e o quinto dia de armazenamento, coincidindo com o momento do início do climatério dos frutos (Figura 15). As mudanças na coloração ocorridas durante o processo de amadurecimento dos frutos estão relacionadas com processos degradativos e sintéticos das clorofilas e carotenóides, respectivamente (Chitarra & Chitarra, 2005). Andreuccetti *et al.* (2007) também verificaram para frutos de tomate expostos a etileno exógeno a antecipação na mudança de cor. A antecipação na mudança de cor dos frutos tratados com relação ao controle deve-se ao aumento na velocidade dos processos metabólicos provocados pelo etileno exógeno (Davies & Robinson, 1981). O surgimento da cor amarela da casca do fruto devido à redução de clorofila e produção de carotenóides é estimulado pela presença deste hormônio gasoso (Abeles, 1992).

A firmeza da polpa dos frutos tratados com etileno exógeno caiu rapidamente desde o primeiro dia de armazenamento e manteve-se baixa

(Figura 18). Os frutos controle tiveram uma queda mais acentuada na firmeza da polpa entre o quarto e o quinto dia de armazenamento coincidente com a subida na emissão de etileno. Pode-se inferir a partir destes resultados que o tratamento dos frutos com etileno provocou uma diminuição na firmeza da polpa destes quando comparados aos frutos controle. Resultados semelhantes foram observados em frutos de morango, onde o etileno exógeno acelerou a alteração da cor e o amolecimento da polpa (diminuição da firmeza) (Tian et al., 2000).

O TSS não variou durante o armazenamento dos frutos controle, bem como, naqueles tratados com o etileno, mantendo-se próximo a 10 °Brix (Figura 19), resultado semelhante ao observado no ensaio anterior (Figura 12). Azevedo et al. (2007) também já haviam verificado resultado semelhante, onde o TSS da polpa do mamão 'Golden' variou muito pouco durante o amadurecimento do fruto. Tal resultado já era esperado, uma vez que o mamão possui pouquíssima reserva de amido, o que impede que haja grandes variações no conteúdo de açúcares durante o seu amadurecimento (Paull, 1996). Frutos de manga colhidos no estágio pré-climatérico e expostos a etileno exógeno não tiveram alterações significativas nos valores de AT, sólidos solúveis e pH (Coneglian & Rodriguez, 1993). Morangos tratados com etileno exógeno também não tiveram seu teor de sólidos solúveis alterado com relação aos frutos controle (Tian et al., 2000).

A AT dos frutos tratados diminuiu durante o período de amadurecimento variando entre 0,14 e 0,064% (Figura 20). A variação foi significativa entre o quinto dia e o início do armazenamento (tempos 0 e 1). Entretanto, parece que a aplicação de etileno exógeno induziu a uma pequena diminuição no conteúdo ácido dos frutos.

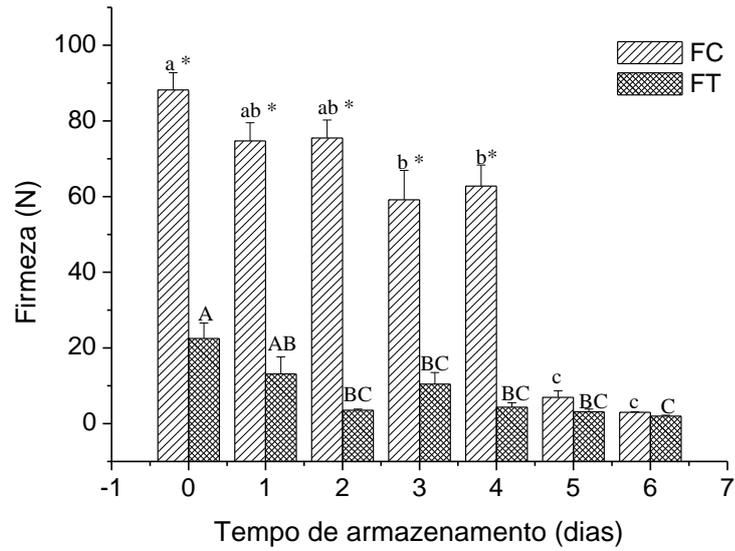


Figura 18 - Firmeza da polpa do mamão sob amadurecimento natural (FC, frutos controle) e em frutos submetidos à exposição de 1ppm de etileno por 24h (FT, frutos tratados) em função do tempo de armazenamento. A significância entre os dias foi determinada por análise de variância seguida do teste Tukey a 5%. As letras correspondem à comparação entre os dias de avaliação no mesmo tratamento, o asterisco demonstra que houve diferença significativa entre os tratamentos no dia de avaliação.

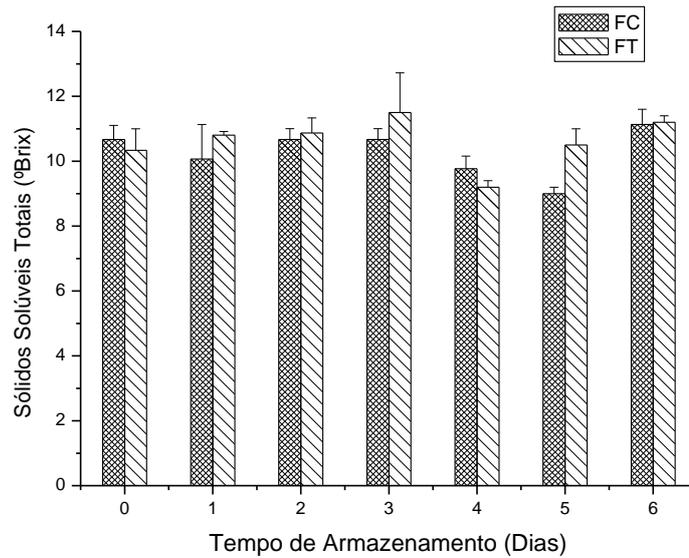


Figura 19 - Teor de sólidos solúveis totais em frutos de mamoeiro 'Golden' sob amadurecimento natural (FC, frutos controle) e em frutos submetidos à exposição de 1ppm de etileno por 24h (FT, frutos tratados) em função do tempo de armazenamento. Teste de análise de variância não significativo.

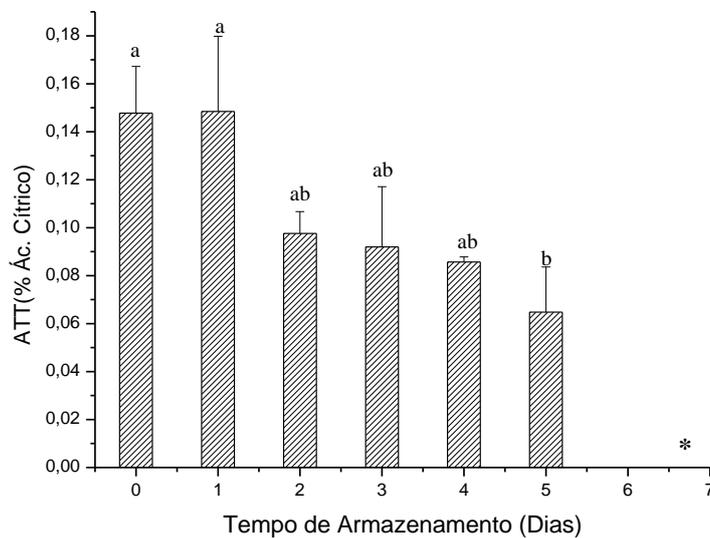


Figura 20- Acidez Titulável em frutos de mamoeiro 'Golden' submetidos à exposição de 1ppm de etileno por 24h, em função dos dias de armazenamento. A significância entre os dias foi determinada por teste de análise de variância seguida do teste Tukey a 5%. O Asterisco corresponde a dados perdidos.

A atividade da bomba de prótons nos frutos expostos ao etileno exógeno manteve-se mais baixa comparada aos frutos controle, do início ao quarto dia de armazenamento (Figura 21). A taxa mínima de atividade da bomba foi verificada no segundo dia de armazenamento, um dia após o pico de etileno destes frutos (Figura 15). O tratamento controle manteve o padrão encontrado nos frutos do ensaio anterior, com a atividade ATPásica em queda desde o início do armazenamento dos frutos e apresentando uma queda mais significativa entre o quarto e o quinto dias, coincidindo com a ascensão na emissão do etileno.

O resultado que mostra os frutos tratados com o etileno exógeno apresentando menor atividade da bomba de prótons sugere fortemente que este hormônio pode estar atuando como um modulador negativo da bomba H^+ -ATPase do tipo P no mamão 'Golden'. Esta tendência se repete nos frutos amadurecidos naturalmente onde a atividade da bomba diminui coincidentemente durante o aumento na taxa de emissão do etileno.

O etileno é um hormônio modulador de diversos processos essenciais para o amadurecimento do fruto e sua atividade está vinculada à sua ligação a um receptor de membrana, formando um complexo ativado que desencadeia diversas reações em cascata. Estas reações levam a modificações da expressão gênica com conseqüentes respostas fisiológicas e bioquímicas no fruto (Lelièvre,1997). A interação entre fitormônios promotores e reguladores do amadurecimento parece controlar este processo, o etileno e o ácido abscísico (ABA) são considerados promotores, enquanto as giberelinas e as citocininas são inibidores (Vendrell & Palomer, 1997). Verificou-se em *Arabidopsis* uma despolarização da membrana plasmática induzida por ABA, a qual se atribuiu a uma inibição da atividade da H^+ -ATPase do tipo P e da ativação de canais iônicos (Brault *et al.*,2004).

A diminuição na atividade da bomba de prótons de membrana plasmática sob influência do hormônio etileno verificada neste trabalho parece indicar o início do processo de senescência no fruto, sendo desencadeado através da diminuição no metabolismo energético celular. As bombas eletrogênicas são mecanismos importantíssimos para a manutenção do estado de energização das membranas celulares. A queda na atividade destas bombas resulta em uma despolarização da membrana

plasmática, o que pode afetar no transporte de solutos através desta e, de uma forma geral, em toda a dinâmica energética da célula. Como estas bombas são responsáveis por prover todo o potencial energético para os transportadores secundários através do gradiente eletroquímico formado, a diminuição em sua atividade poderá resultar em grandes alterações no metabolismo celular.

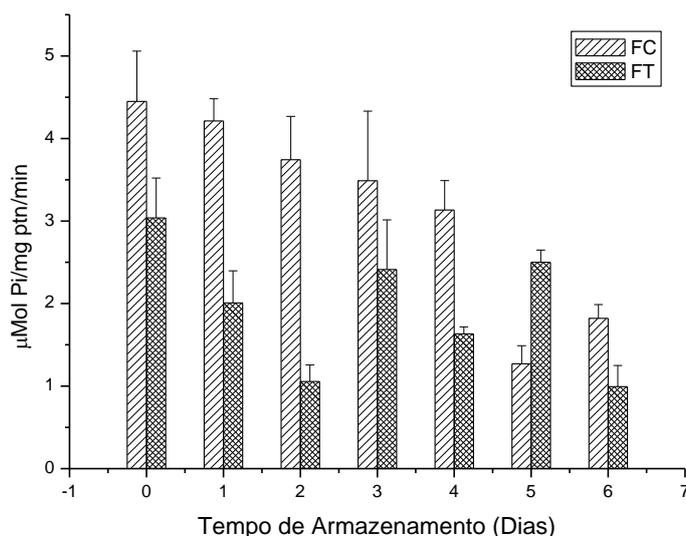


Figura 21 - Atividade ATPásica, vanadato sensível, em membrana plasmática de tecido de polpa de mamão 'Golden' sob amadurecimento natural (FC, frutos controle) e em frutos submetidos à exposição de 1ppm de etileno por 24h (FT, frutos tratados) em função tempo de armazenamento. Os dados são apresentados como uma média de 3 repetições, acompanhados da barra de erro padrão.

5.2 Inibição do Amadurecimento de frutos

Os frutos deste tratamento foram expostos ao 1-MCP, um inibidor da ação do etileno. Como pode ser observado os frutos tratados tiveram um atraso de dois dias no tempo para a ocorrência do pico de etileno em comparação aos frutos controle (Figura 22). O 1-MCP age como inibidor da ação do etileno ao se ligar de forma irreversível ao receptor deste, impedindo sua ligação. Neste caso observa-se que mesmo aparecendo um pico de etileno, característico de frutos climatéricos, estes frutos tratados

emitiram menos etileno, comparado aos frutos controle, durante todo o período de avaliação.

A taxa respiratória máxima nos frutos tratados com o 1-MCP ocorreu um dia após a observada nos frutos controle e um dia após a emissão do pico de etileno (Figura 23). Este resultado indica que o 1-MCP teve efeito na inibição da ação do etileno atrasando o pico climatérico nos frutos tratados. Outros autores também verificaram em kiwi, mamão, banana e abacate redução na produção de etileno após tratamento com 1-MCP (Koukounaras & Sfakiotakis, 2007; Manenoi *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 1999; Xuqiao *et al.*, 2000).

A alteração na coloração dos frutos tratados evoluiu mais lentamente em comparação àquela dos frutos controle (Figura 24). A mudança do verde para o amarelo nos frutos controle aconteceu concomitantemente com o aumento na produção de etileno. O surgimento da cor amarela da casca do fruto é devido à degradação das clorofilas e síntese de carotenóides, modulado pelo etileno, responsável pelo amadurecimento dos frutos (Abeles, 1992). Como os frutos tratados estiveram sujeitos a uma menor ação do etileno, é entendido porque os mesmos tiveram manutenção da cor verde por mais tempo. A manutenção da cor por mais tempo também foi verificada para frutos de kiwi tratados com 1-MCP (Koukounaras & Sfakiotakis, 2007), e verificada por Calvo & Sozi (2009) para peras tratadas com este mesmo inibidor da ação do etileno.

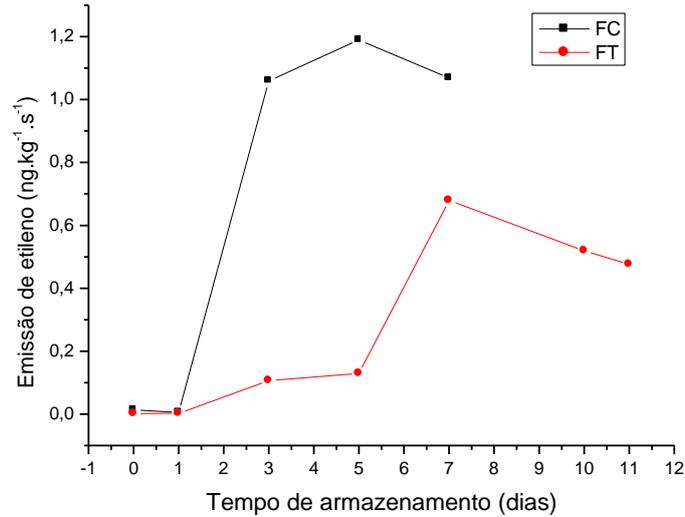


Figura 22 – Taxa de emissão de etileno em mamoeiro ‘Golden’, sob amadurecimento natural (FC, frutos controle) e em frutos tratados com 1-MCP (50 nL/L) por 12h (FT, frutos tratados) em função do tempo de armazenamento. Os dados são apresentados como uma média de 3 repetições.

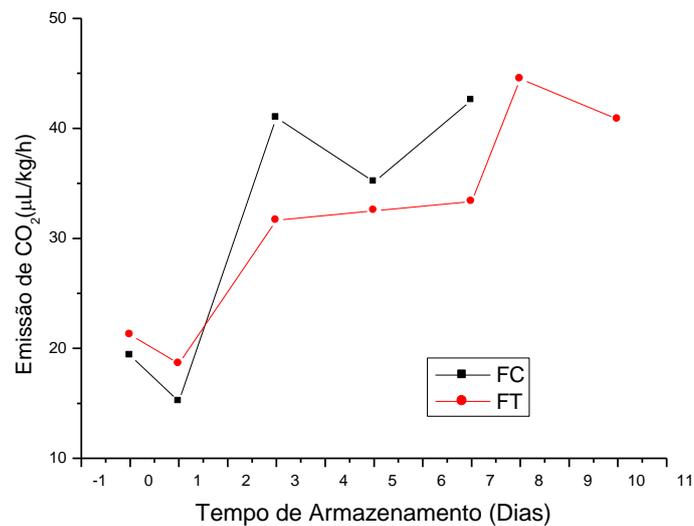


Figura 23 – Taxa de emissão de CO₂ em frutos de mamoeiro, ‘Golden’, sob amadurecimento natural (FC, frutos controle) e em frutos submetidos à exposição de 1-MCP por 12h (FT, frutos tratados) em função do tempo de armazenamento. Os dados são apresentados como uma média de 3 repetições.

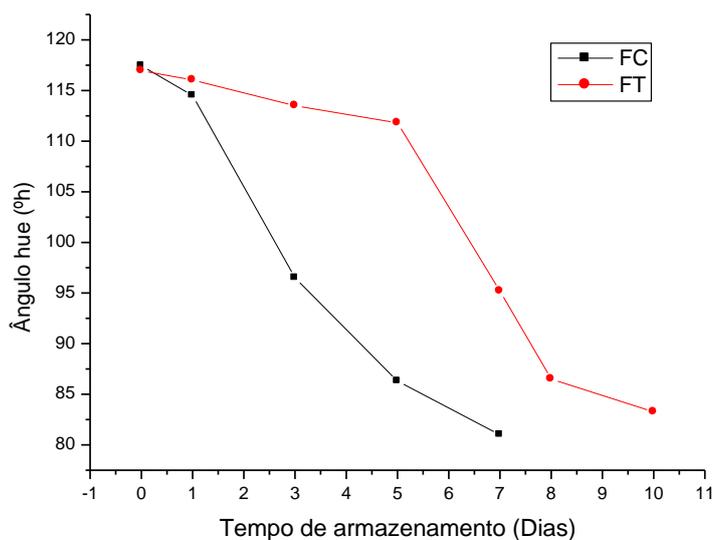


Figura 24 – Evolução temporal da variação do ângulo Hue durante a inibição do amadurecimento de frutos de mamoeiro 'Golden'. Valores de "hue" ($^{\circ}h$) próximos de 90° indicam coloração amarelada, ângulo próximo de 180° é indicativo de coloração verde.

A firmeza dos frutos tratados manteve-se alta durante todo o período de armazenamento (Figura 25), enquanto nos frutos controle caiu rapidamente entre o primeiro e o terceiro dia de armazenamento, coincidindo com o aumento na emissão do etileno. Esta tendência de queda da firmeza com o aumento na produção de etileno seguiu o mesmo padrão dos frutos amadurecidos naturalmente (tratamento 1) e dos tratados com etileno (tratamento 2). O amaciamento da polpa do mamão durante o amadurecimento é atribuído à ação de enzimas que degradam componentes da parede celular (Smith et al., 2003), e o etileno por ser o hormônio responsável por desencadear os processos do amadurecimento, também é considerado como o responsável pela ativação destas enzimas que resultam na perda de firmeza pelo fruto (Paull & Chan, 1983; Abeles et al., 1992). Como o 1-MCP atua inibindo a ação deste hormônio nos frutos é esperado que frutos tratados mantenham por mais tempo a firmeza. Foi verificado em peras, tratadas com 1-MCP, que o amaciamento de sua polpa foi também fortemente diminuído (Calvo & Sozzi, 2009).

Os resultados verificados em frutos de mamoeiro tratados com o inibidor diferem dos demais, no sentido em que os frutos mesmo após terem

emitido o pico de etileno, mantêm a firmeza alta consideravelmente, retardando o amaciamento da polpa do fruto. Ainda há dúvidas quanto à causa desta falha no amaciamento da polpa do mamão, o que se sabe até o momento é que de certa forma o 1-MCP parece desativar algum dos mecanismos bioquímicos (Souza, 2008) que acarretam na ativação das enzimas responsáveis pelo amaciamento da polpa.

O teor de sólidos solúveis não variou entre os frutos tratados com 1-MCP e os frutos controle durante o período avaliado (Figura 26). Este mesmo resultado também foi observado para os frutos amadurecidos naturalmente e induzidos a amadurecer que, conforme descrito anteriormente, se deve a insignificante reserva de amido na polpa do mamão (Paull, 1996). Esta tendência já havido sido verificada por Jacomino et al. (2002) em mamão 'Sunrise Solo' submetido à exposição a diferentes concentrações de 1-MCP.

A acidez titulável também não mostrou variação nos frutos tratados com o inibidor, durante o período avaliado (Figura 27). Os valores da AT variaram de 0,21 % a 0,22 % de ácido cítrico, sendo maiores do que os encontrados para os frutos dos tratamentos 1 e 2. Alguns autores relatam o aumento na acidez titulável durante o amadurecimento de mamão (Paull, 1993; Reis Silva & Medina, 1997; Bicalho, 1998), enquanto outros afirmam que com o fruto totalmente maduro esta acidez diminui (Lopes, 1997; Bicalho, 1998; Azevedo et al., 2008).

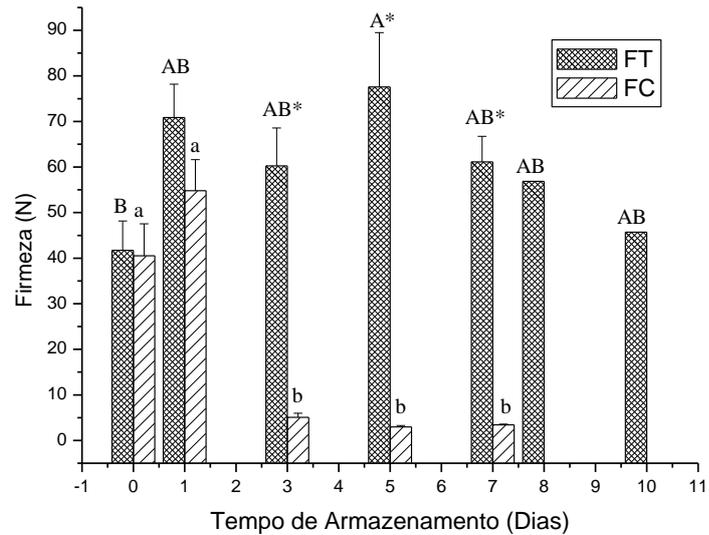


Figura 25 - Avaliação da firmeza da polpa em frutos de mamoeiro sob amadurecimento natural (FC, frutos controle) e em frutos submetidos à exposição de 1-MCP por 12h (FT, frutos tratados) em função do tempo de armazenamento. A significância entre os dados foi determinada por análise de variância seguida do teste Tukey a 5%. As letras correspondem à comparação entre os dias de avaliação no mesmo tratamento, o asterisco demonstra que houve diferença significativa entre os tratamentos no dia de avaliação. A partir do tempo 8 os frutos controle estavam impróprios para consumo, por isso não se apresentam os dados.

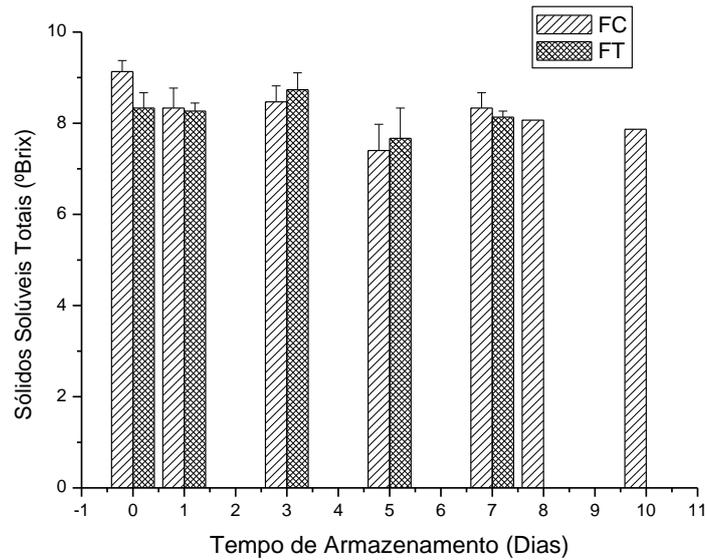


Figura 26 - Teor de sólidos solúveis totais em frutos de mamoeiro 'Golden', sob amadurecimento natural (FC, frutos controle) e em frutos submetidos à exposição de 1-MCP por 12h (FT, frutos tratados) em função do tempo de armazenamento. Teste de variância não significativo.

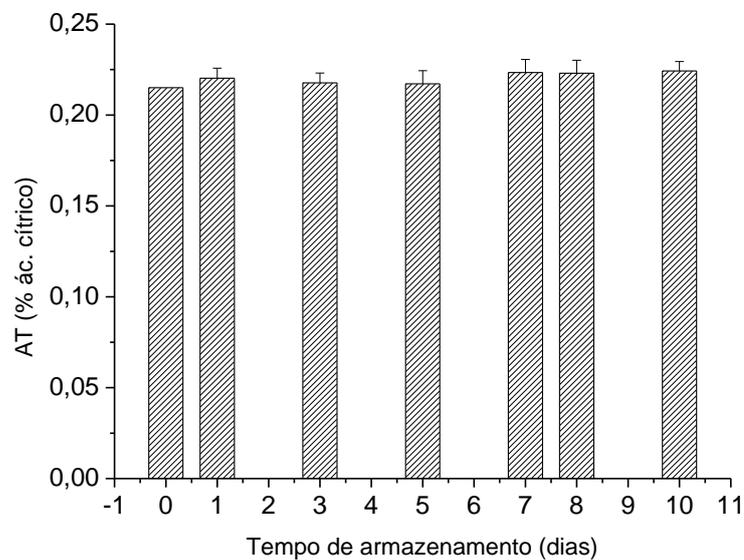


Figura 27- Acidez total titulável em frutos de mamoeiro 'Golden' submetidos à exposição de 1-MCP por 12h, em função do tempo de armazenamento. Teste de variância não significativo.

A atividade ATPásica dos frutos tratados com 1-MCP manteve-se mais alta que a dos frutos controle durante quase todo o período avaliado, apresentando-se menor apenas no tempo 0 de armazenamento (Figura 28). Nos frutos expostos ao 1-MCP a atividade ATPásica foi menor no quinto dia de armazenamento. O 1-MCP é um inibidor não competitivo que bloqueia a ligação do etileno ao seu receptor ao se ligar irreversivelmente ao receptor do hormônio (Sisler & Serek, 1997). Dessa forma, os frutos tratados foram, em tese, expostos a uma menor concentração de etileno, já que estavam sobre a ação do 1-MCP. O resultado que mostra a atividade da bomba de prótons do tipo P mantendo-se mais alta nos frutos tratados, quando comparados com os frutos controle, é um indicativo de que a ausência, ou a diminuição da quantidade de etileno nestes frutos é um promotor da atividade ATPásica da bomba.

Como verificado por Azevedo *et al.* (2008) e pelos outros tratamentos efetuados neste trabalho, a atividade da bomba H^+ -ATPase tipo P tende a diminuir quando a concentração de etileno no tecido aumenta em função do período climatérico. Tais resultados levam a um forte indício de que o hormônio etileno deve agir modulando negativamente a atividade desta bomba de prótons.

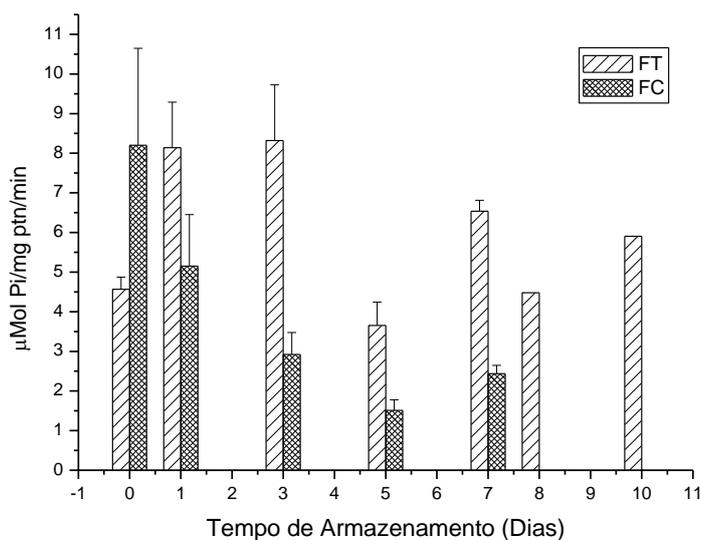


Figura 28 - Atividade ATPásica, vanadato sensível, em membrana plasmática de tecido de polpa de frutos de mamoeiro 'Golden', sob amadurecimento natural (FC, frutos controle) e em frutos submetidos à exposição de 1-MCP por 12h (FT, frutos tratados) em função do tempo de armazenamento. Os dados são apresentados como uma média de 3 repetições, acompanhados da barra de erro padrão.

Está bem esclarecida a ação do etileno em diversas funções fisiológicas nas plantas como indução do amadurecimento em frutos climatéricos e os vários eventos associados a este período tais como a degradação e síntese de pigmentos, por exemplo síntese de carotenóides e a degradação de clorofilas (Bleiroth & Sigrist, 1989), as interconversões de carboidratos responsáveis pelos sabores, a síntese de compostos voláteis, os processos envolvidos com o amaciamento da polpa provocados devido ao aumento das atividades enzimáticas (celulase e poligalacturonase) relacionadas com a degradação de componentes de parede celular (Chan Jr., 1991) dentre outros. Ele modula diversos processos metabólicos envolvidos no amadurecimento de frutos através da coordenação da expressão gênica que envolve o aumento da taxa respiratória, a degradação de clorofila e a síntese de carotenóides na casca do fruto, a interconversão de açúcares, o aumento na atividade de enzimas que degradam a parede celular e até mesmo a produção auto-catalítica de etileno (Gray *et al.*, 1992).

Ao se verificar neste trabalho que o etileno aparece como modulador do aporte primário de energia na membrana plasmática durante o processo

de amadurecimento, há um indicativo de diminuição no transporte de solutos e possivelmente da atividade enzimática celular. Isso pode estar sinalizando uma diminuição gradativa da atividade metabólica do fruto como início do processo de senescência.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho evidencia que o hormônio etileno atua como um modulador negativo da H^+ -ATPase do tipo P durante o amadurecimento do mamão. A diminuição na atividade desta bomba sob influência do etileno durante o período do climatério é um indicativo que essa tenha uma participação efetiva no amadurecimento destes frutos. A conseqüente diminuição no aporte energético da membrana celular resultante da modulação da H^+ -ATPase de membrana plasmática evidencia uma forma de regulação do transporte secundário pelo etileno durante o amadurecimento, também podendo sinalizar mudanças metabólicas relacionadas ao processo de senescência destes frutos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYSTS CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 15 ed, Arlington, 1992.

Abeles, F.B.; Morgon, P.W. ; Saltveit Jr., M.E. Fruit **ripening, abscission, and postharvest disorders**. In: Abeles, F.B.; Morgon, P.W.; Saltveit Jr., M.E. (eds.) Ethylene in Plant Biology. 2nd edn. San diego, Academic Press, p. 414,1992.

Andreuccetti, C; Ferreira, M.D; Moretti, C.L; Honório, S.L. **Qualidade pós-colheita de frutos de tomate cv. Andréa tratados com etileno**. Horticultura Brasileira 25:122-126. 2007.

Ali, Z.M.; Ng, S.Y.; Othman, R.; Gho, L.Y.; Lazan, H. **Isolation characterization and significance of papaya b-galactanases to cell wall modification and fruit softening during ripening**. Physiologia Plantarum, v. 104, p. 105-115, 1998.

Almeida, C. O. **Fruticultura brasileira: de abacaxi em abacaxi chegaremos lá**. In: Feitosa, C. (ed.) I Semana Acadêmica de Horticultura do Espírito Santo, SEAHORTES. Alegre, 2003.

Almeida, D.P.F.; Huber, D.J. **Apoplastic pH and inorganic ion levels in tomato fruit: a potential means for regulation of cell wall metabolism during ripening.** *Physiology Plantarum*, v. 105, p. 506-512, 1999.

Álvares, V. S., **Amadurecimento e qualidade da banana 'Prata'(Musa AAB subgrupo prata) submetida a diferentes concentrações de etileno.** Tese (Curso de Fitotecnia "Magister Scientiae") Universidade Federal de Viçosa, 2003.

Azevedo, I. G.; Oliveira, J.G.; Silva, M.G.; Pereira,T.; Correia, S.F.; Vargas, H.; Façanha, A. R. **P-type H⁺-ATPases activity, membrane integrity, and apoplastic pH during papaya fruit ripening.** *Postharvest Biology and Technology*, v. 48, p. 242-247, 2008.

Balbino, J. M. S. ; Costa, A.F.S. Crescimento e desenvolvimento dos frutos do 'Grupo Solo' e padrão de qualidade. In: Martins, D.S.; Costa, A.F.S. **A cultura do mamão: tecnologias de produção.** Vitória –ES, Incaper, 2003.

Balbino, J.M.S. Colheita, pós-colheita e fisiologia do amadurecimento do mamão. In: Martins, D.S., Costa, A.F.S. (eds.) **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção.** Vitória - ES, 2003.

Barry, C.S.; Llop-Tous, M.I.; Grierson, D. **The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid syntase gene expression during transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato.** *Plant Physiology*, v.123, n. 3, p. 979–986, 2000.

Bartz, J. A.; Brecht, J. A. **Postharvest physiology and pathology of vegetables.** New York: Marcel Dekker, 733 p., 2003.

- Ben-Arie, R., Faust, M. **ATPase in ripening strawberries**. Phitochemistry, v. 19, p.103-128, 1980.
- Berilli, S. S.; Oliveira, J. G.; Marinho, A. B., Lyra, G.B.; Sousa, E. F.; Viana, A. P.; Bernardo, S; Pereira, M. G. **Avaliação da taxa de crescimento de frutos de mamão (*Carica papaya* L.) em função das épocas do ano e graus-dias acumulados**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 1, p. 011-014, 2007.
- Bicalho, U. de O. **Vida útil pós-colheita de mamão submetido a tratamento com cálcio e filme de PVC**. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras - Lavras, 1998.
- Blankenship, S.M.; Dole, J. M. **1-Methylcyclopropene: a review**. Postharvest Biology Technology, v. 28, n. 1, p. 1-25, 2002.
- Bleecker, A. & Kende, H. **Ethylene: a gaseous signal molecule in plants**. Annual Review Plant Physiology, v. 16, p. 1-18, 2000.
- Bradford, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Analytical Biochemistry, v. 72, p 248-259, 1976.
- Brady, C.J. **Fruit ripening**. Annual Review Plant Physiology, n. 38, p. 155-178, 1987.
- BRAPEX. **Associação Brasileira dos Exportadores de Papaya**. Disponível em: <http://www.brापex.net>. Acesso em: Novembro, 2007.
- Brasil. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária - SDR - FRUPEX. **Mamão para exportação: Aspectos Técnicos da Produção**. EMBRAPA, Brasília – DF, 52 p.,1994.

- Brault, M. ; Amiar, Z. ; Pennarun, A.M. ; Monestiez, M.; Zhang, Z. ; Cornel, D.; Dellis, O. ; Knight, H. ; Bouteau, F. ; Rona, J.P. **Plasma Membrane Depolarization Induced by Abscisic Acid in Arabidopsis Suspension Cells Involves Reduction of Proton Pumping in Addition to Anion Channel Activation, Which Are Both Ca²⁺ Dependent.** Plant Physiology 135:231-243, 2004
- Briskin, D.P. & Leonard, R.T. **Partial characterization of a phosphorylated intermediate associated with the plasma membrane ATPase of corn roots.** Academics Science USA, v. 79, n. 22, p. 6922–6926, 1982.
- Brummel, D.A.; Hall, J.L. **Rapid cellular response to auxin and the regulation of growth.** Plant Cell Environment, v. 10, n. 7, p. 523-543, 1987.
- Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plants.** Editora Address editorial correspondence to American Society of Plant Physiologists, Monona Drive, Rockville, USA, 1366 p., 2000.
- Calvo, G. ; Sozzi, G. **Effectiveness of 1-MCP treatments on ‘Bartlett’ pears as influenced by the cooling method and the bin material.** Postharvest Biology and Technology, n.51, p. 49–55, 2009.
- Casas, A.; Llacér, J. **El color de los frutos cítricos. III. Modificación del color mediante tratamientos pre-recolección.** Revista de Agroquímica y Tecnología de alimentos, Valencia, v.29, n.2, p. 173-190, 1989.
- Cervantes, E. **Ethylene: new interactions, still ripening.** Trends in plant science, v. 7, n. 8, p. 334-335, 2002.

- Chan, Jr H.T.; Hibbard, K.; Goo, T.; Akamine, E.K. **Sugar composition of papayas during fruit development.** Horticultural Sciences , v.14, n.2, p.140-141, 1979.
- Chen, M.H.; Chen, C.C.; Wang, D.N.; Chen, F.C. **Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Carica papaya* x *Carica cauliflora* cultured in vitro.** Canadian Journal of Botany, Ottawa, v. 9, n. 6, p. 320-324, 1991.
- Chitarra, M.I.F.; Chitarra, A.B. **Pós-Colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio.** Lavras : ESAL/FAEP, 785 p., 2005.
- Coneglian, R.C.C.; Rodrigues, J.D. **Efeito da aplicação do Etileno no pH, acidez, índice refratrométrico e açúcares totais de frutos de manga, colhidos em estágio pré-climatérico.** Sci. Agri. , Piracicaba, v.50, n.2, p. 185-192, 1993.
- Corrêa, S.F. **Utilização de técnicas fototérmicas no estudo da pós-colheita do mamão (*Carica papaya* L.).** Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2005.
- Costa, A. de F. S. da; Balbino, J. M. de S. **Mamão: pós-colheita.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca Fruticultura (Frutas do Brasil, 21), p.59, 2002.
- Cruz, C.D. **Programa GENES: estatística experimental e matrizes.** Viçosa: Editora UFV, p. 285, 2006.
- Dantas, J. L. L. & Castro Neto, M. T. DE. Aspectos botânicos e fisiológicos. *In:* Trindade, A. V. **Mamão produção: Aspectos técnicos** Brasília: EMBRAPA – CNPMFT, 2000.

- Davies JN; Hobson GE. **The constituents of tomato fruit – The influence of environment, nutrition and genotype.** *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Cleveland, v.15, n.3, p.205-208, 1981.
- Dietz, K.J.;Tavakoli, N.; Kluge, C.; Mimura, T.; Sharma, S.S.; Harris, G.C.; Chardonnens, A.N.; Golldack, D. **Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level.** *Journal Experimental Botany.*, v. 52, n. 363, p. 1969-80, 2001.
- Domingos, P.F.A. & Huber, D. J. **Apoplastic pH and inorganic ion levels in tomato fruit: a potential means for regulation of cell wall metabolism during ripening.** *Physiology Plantarum*, v.105, n. 3, p. 506-512,1999.
- Façanha, A. R. & De Meis, L. **Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes.** *Plant Physiology*, Rockville, v. 108, p. 241-246, 1995.
- Fiske, C. F. & Subbarow, Y. **The colorimetric determination of phosphorus.** *Journal of Biological Chemistry*,v. 66, p. 375, 1925.
- Gallagher, S.R. & Leonard, R.T. **Effect of vanadate, molybdate and azide on membrane-associated ATPase and soluble phosphatases activities of corn roots.** *Plant Phisology*, v. 84, p. 613-618, 1982.
- Giannini, J.L. & Briskin, D.P. **Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue.** *Plant Physiology*, v. 84, p. 613-618, 1987.
- Giovannini, K. F. R.; Souza, M. S.; Pimentel, D.C.; Gomes Filho, A.; Aguiar, K. P.; Souza, M. C.; Pereira, M G.; Oliveira, J.G. **Conteúdo de vitamina C em frutos de mamão (*Carica papaya* L.). Influência do tempo de armazenamento e da época de colheita.** *In: Oliveira, J.G.*

(ed.). Boletim Técnico da II Reunião de pesquisa do FRUTIMAMÃO, p. 173-177, 2004.

Giovannoni, J.J. **Genetic regulation of fruit development and ripening.** The plant cell, v. 16, p. 170–180, 2004.

Gomez, M.; Lajolo, F.; Cordenunsi, B. **Evolution of Soluble Sugars During Ripening of Papaya Fruit and its Relation to Sweet Taste.** Journal of Food Science, v. 67, n. 1, p. 442-447, 2002.

Gray, J.; Picton, S.; Shabeer, J.; Schuch, W.; Grierson, D. **Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes.** Plant Molecular Biology, v. 19, n. 1, p 69-87, 1992.

Hayama, H.; Tatsuki, M.; Ito, A.; Kashimura, Y. **Ethylene and fruit softening in the *stony hard* mutation in peach.** Postharvest Biology and Technology, v.41, p.16–21, 2006

Hedrich, R. & Schroeder, J.I. **The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plant cells.** Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v. 40, p. 539-569, 1989.

Heyes, J.A. & Vré, L.A. **Plasma membrane ATPase activity during pepino (*Solanum muricatum*) ripening.** Physiology Plantarum, v.101, n.3 , p. 570-576, 1997.

Huber, D.J. & O'Donoghue, E. M. **Polyuronides in avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicum esculentum*) fruits exhibit markedly different patterns of molecular weight downshifts during ripening.** Plant Physiology, v. 102, p. 473-480, 1993.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Produção Agrícola Municipal. Disponível em: www.ibge.br Acessado em: Novembro de 2007.

IBRAF. **Instituto Brasileiro de Frutas**. Estatísticas Exportação 2007. Disponível em: www.ibraf.org.br/estatisticas/exportacao.asp Acessado em: Janeiro de 2008.

Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo: O Instituto. 3. ed. v. 1, 533 p., 1985.

Jiang, Y.M.; Joyce, D.C., Macnish, A.J **Responses of banana fruit to treatment with 1-methylcyclopropene**. Plant Growth Regul., n.28, p.77-82, 1999.

Kasamo, K. & Sakakibara, Y. **The plasma membrane H⁺-ATPase from higher plants: functional reconstitution into liposomes and its regulation by phospholipids**. Plant Science, v. 111, n. 2, p. 117-131, 1995.

Kays, S.T. **Postharvest physiology of perishable plant products**. New York: A VI, p. 532, 1994.

Koukounaras, A. ; Sfakiotakis, E. **Effect of 1-MCP prestorage treatment on ethylene and CO₂ production and quality of 'Hayward' kiwifruit during shelf-life after short, medium and long term cold storage**. Postharvest Biology and Technology, n.46, p.174–180, 2007

Kluge, R. A.; Nachtigal, J. C.; Fachinello, J. C.; Bilhalva, A. B. **Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado**. Campinas-SP: Livraria e Editora Rural Ltda. ed. 2. 214p, 2002.

Lelièvre, J. M.; Latché, A.; Jones, B.; Bouzayen, M.; Pech, J. C. **Ethylene and fruit ripening**. Physiology Plantarum, v.101, n. 4, p. 727-739, 1997.

- Lopes, M. A. **Conservação do mamão em condições ambiente submetido a aplicação de cera e cloreto de cálcio.** Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura de Mossoró – Mossoró, 1997.
- Lurie, S.; Ben-Arie, R. **Characterization of plasmalemma ATPase from apple fruit.** *Phytochemistry*, v.22, p.49-52, 1983.
- Manenoi, A. ; Bayogan, E.R.V. ; Thumdee, S. ; Paull, R.E. **Utility of 1-methylcyclopropene as a papaya postharvest treatment.** *Postharvest Biology and Technology*, n.44, p.55–62, 2007
- Manica, I.; Martins, D.S.; Ventura, J.A. **Mamão tecnologia de produção, pós-colheita, exportação, mercados.** Porto Alegre: Cinco Continentes, 2006.
- Manrique, G.D. & Lajolo, F.M. **FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit.** *Postharvest Biology Technology*, v. 25, n. 1, p. 99-107, 2002.
- Marin S.L.D; Gomes, I.D.; Alves, F. de L. **Introdução, avaliação e seleção do mamoeiro cv. Improved Sunrise Solo Line 72/12 no Estado do Espírito Santo.** Vitória, ES: EMCAPA, 13 p., 1989.
- Marre, E. **Integration of solute transport in cereals.** In: *Recent Advances in the biochemistry of cereals.* New York, 391 p.,1979.
- McGuire, R.G. **Reporting of Objective Color measurements.** *HortScience*, v.27, n. 12, p. 1254-1255, 1992.
- McMurchie, E.J.; McGlasson, W.B.; Eaks, I.L. **Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene.** *Nature*, 1972

- Milner, I.D.; Ho, L.C.; Hall, J.L. **Properties of próton and sugar transport at the tonoplast of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit.** *Physiologia Plantarum* v. 94, p. 399-410, 1995.
- Molinari, A.C.F. **Métodos combinados para preservar a qualidade do mamão 'Golden' tipo exportação.** 2007. 128f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- Morsomme, P. & Boutry, M. **The Plant plasma membrane H⁺- ATPase: structure, function and regulation.** *Biochemistry Biophysics Acta*, v. 1465, p. 1-16, 2000.
- Morton, J. Papaya. In: **Fruits of warm climates.** Miami, FL, p. 336–346, 1987.
- Oetiker, J.H.; Yang, S.F. **The role of ethylene in fruit ripening.** *Acta Horticultural*, v.398, p.167-178, 1995.
- Palmgren, M. G. **Plant Plasma membrane H⁺- ATPases : Powerhouses for nutrient uptake.** *Annual Review Plant Physiology*, v. 52, p. 817-45, 2001.
- Paull R.E. **Pineapple and papaya.** *Biochemistry of fruit ripening.* London: Chapman & Hall, p. 302-315, 1993.
- Paull, R.E.; Chan, N.J. **Postharvest variation in cell wall-degrading enzymes of papaya (*Carica papaya* L.) during fruit ripening.** *Plant Physiology*, n.72, v.2, p. 382-323, 1983
- Peng, Y.B.; Lu, Y.F.; Zhang, D.P. **Abscisic acid activates ATPase in developing apple fruit especially in fruit phloem cells.** *Plant Cell and Environment*, v. 26, n. 8, p. 1329-1342, 2003.

- Poole, R.J. **Energy coupling for membrane transport**. Annual Review Plant Physiology, v. 29, p. 437-460, 1978.
- Reis Silva, J. R.; Medina, V. M. ; **Alterações bioquímicas durante o desenvolvimento do fruto do mamoeiro 'Sunrise Solo'**. Revista Brasileira de Fruticultura, Cruz das Almas, v.19, n.2, p.149-158, 1997
- Robinson, S.P.; Davies, C. **Molecular biology of grape berry ripening**. Aust J Grape Wine Res, v. 6, p.175-188, 2000.
- Ritzinger, C.H.P.; Souza, J.S. **Mamão: Fitossanidade**. Cruz das Almas. EMBRAPA, 91 p., 2000.
- Sangwanankul, P. & Paull R.E. **The Role of Hexose Transporter in Sugar Accumulation of Papaya Fruit during Maturation and Ripening**. Acta Horticultural, v. 740, p. 313-316, 2007.
- SEAG - **Secretaria da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca**. Disponível em: www.es.gov.br/seag Acessado em: Novembro de 2007.
- Serrano, R. **Structure and function of plasma membrane ATPase**. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v. 40, p. 61-94, 1989.
- Shiratake, K. & Martinoia, E. **Transporters in fruit vacuoles**. Plant Biotechnology, v. 24, p.127–133, 2007.
- Silva, M.G.; Lima, J.A.P.; Sthel, M.S.; Marin, E.; Gatts, C.E.N.; Cardoso, S.L.; Campostrini E.M.G.; Campos, A.C.; Massunaga, M.S.O.; Vargast, H. **Ethylene and CO₂ emission rates in tropical fruits investigated by infrared absorption techniques**. Analytical Sciences. v. 17 (Special), 2001.

- Silva, M.G.; Oliveira, J.G.; Vitória, A.P.; Correa, S.F.; Pereira, M.G.; Campostrini, E.; Santos, E.O.; Cavalli, A.; Vargas, H. **Correlation between ethylene emission and skin colour changes during papaya (*Carica papaya* L.) fruit ripening.** Journal de Physique IV. v. 125, p.877–879, 2005.
- Simão, S. Mamoeiro. In: **Tratado de Fruticultura.** Piracicaba: FEALQ, 760 p., 1998.
- Sisler, E.C. & Serek, M. **Inhibitors of ethylene responses in plants at receptor level: recent developments.** Physiology Plantarum, v. 100, n. 3, p. 577-582, 1997.
- Smith, F. A. & Raven, J.A. **Intracellular pH and its regulation.** Annual Review Plant Physiology, v. 30, p. 289-311, 1979.
- Smith, A.C.; Waldrow, K.W.; Maness, N.; Perkins-Veazie, P. **Vegetable texture: measurement and structural implications.** Postharvest Physiology and Pathology of vegetables. 2.ed. Basel, Switzerland: Marcel Dekker AG, p. 297-329, 2003.
- Sousa, M.S. **Aspectos bioquímicos e anatômicos de frutos de mamão 'Golden' (*Carica papaya* L.) tratados com 1-metilciclopropeno (1-MCP) em diferentes estádios de maturação.** Dissertação de Mestrado. Campos dos Goytacazes, RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 85p., 2008.
- Sussman, M.R. & Harper, J.F. **Molecular biology of plasma membrane of higher plants.** Plant Cell, v. 1, p. 953-960, 1989.
- Sze, H.; Li, X.; Palmgren, M. G. **Energization of Plant Cell Membranes by H-Pumping ATPases: Regulation and Biosynthesis.** The Plant Cell, v. 11, p.677–689, 1999.

- Sze, H. **H⁺ -Translocating ATPases: advances using membrane vesicles.** Annual Review Plant Physiology, v. 36, p. 175-208, 1985.
- Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia Vegetal** 3^a ed. – Porto Alegre: Artmed, 541 p., 2004.
- Terrier, N.; François-Xavier, S.; Ageorges, A.; Romieu, C. **Changes in acidity and in proton transport at the tonoplast of grape berries during development.** Planta, v. 213, p.20-28., 2001.
- Vendramini, A.L.; Trugo, L.C. **Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity.** Food Chemistry, v. 71, n. 2, p. 195-198, 2000.
- Vendrell, M. ; Palomer, X. **Hormonal control of fruit ripening in climateric fruits.** Acta Horticulturae, n.463, p. 325-334, 1997.
- Viegas, P.R.A. **Características químicas e físicas do mamão (*Carica papaya* L) cultivares ‘Sunrise Solo’ e ‘Formosa’ relacionados ao ponto de colheita.** Tese (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Viçosa - MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 82 p., 1992.
- Voesenek, L.A.C.J.; Banga, M.; Rijnders, J.H.G.M.; Visser, E.J.W.; Harren, F.J.M.; Brailsford, R.W.; Jackson, M.B.; Blom, C.W.P.M. **Laser-driven photoacoustic spectroscopy: What we can do with it in flooding research.** Annals of Botany, v. 79, p. 57-65, 1997.
- Wachowicz, C. M. & Carvalho, R. I. N. **Fisiologia vegetal – produção e pós-colheita,** ed. Champagnat, p. 424, 2002.
- Watada, A.E.; Herner; R.C., Kader, A.A.; Romani, R.J.; Staby, G.L. **Terminology for description of developmental stages of horticultural crops.** Horticultural Science, v. 19, n. 1, p. 20-21, 1984.

Yang, S.F. **Biosynthesis and action of ethylene.** Horticultural Science., v. 20, n. 1, p. 41-45, 1985.

Xuqiao, F. ; Apelbaun, A. ; Sisler, E. C.; Goren, R. ; **Control of ethylene responses in avocado fruit with 1-methylcyclopropene.** Postharvest Biology and Technology, n. 20, p. 143–150, 2000.

Zandonadi, D.; Canellas, L.; Façanha, A. **Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation.** Planta, v.225, p. 1583-1595, 2007.

Zhao, R.; Dielen, V.; Kinet, J.M.; Boutry, M. **Cossuppression of a plasma membrane H⁺-ATPase isoform impairs sucrose translocation, stomatal opening, plant growth, and male fertility.** Plant Cell, v.12, p. 535-546.

Zhou, L. **Source-sink relationship during papaya fruit development and ripening.** Ph.D. dissertation, University of Hawaii at Manoa. 1999. Citado por: P. Sangwanangkul and R.E. Paull In: The Role of Hexose Transporter in Sugar Accumulation of Papaya Fruit during Maturation and Ripening. Acta Horticultural., v. 740, p. 313-316, 2007