

CARACTERIZAÇÃO DAS BOMBAS DE PRÓTONS DA POLPA
DE FRUTOS DE MAMÃO (*CARICA PAPAYA* L.) E RELAÇÃO
COM A OCORRÊNCIA DO DISTÚRPIO DA GELIFICAÇÃO

INGA GONÇALVES DE AZEVEDO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO DE 2006

CARACTERIZAÇÃO DAS BOMBAS DE PRÓTONS DA POLPA
DE FRUTOS DE MAMÃO (*CARICA PAPAYA* L.) E RELAÇÃO
COM A OCORRÊNCIA DO DISTÚRPIO DA GELIFICAÇÃO

INGA GONÇALVES DE AZEVEDO

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: Prof. Dr. Jurandi Gonçalves de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JULHO DE 2006

CARACTERIZAÇÃO DAS BOMBAS DE PRÓTONS DA POLPA
DE FRUTOS DE MAMÃO (*CARICA PAPAYA* L.) E RELAÇÃO
COM A OCORRÊNCIA DO DISTÚRBO DA GELIFICAÇÃO

INGA GONÇALVES DE AZEVEDO

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 17 de julho de 2006

Comissão Examinadora:

Prof^a. Angela Pierre Vitória (D. Sc. Biologia Vegetal) – UENF

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

Prof^a. Regina Celi Cavestré Coneglian (D. Sc. Ciências Biológicas) –
UFRRJ

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

À minha mãe, pela dedicação e confiança que permitem trilhar o caminho da vida
sempre ao meu lado.

Dedico esse trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre orienta os meus passos.

Ao Wallace, pelo apoio incondicional durante todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira, pela orientação, incentivo e confiança.

Ao Prof. Arnaldo Rocha Façanha, pela co-orientação e pelos seus valiosos ensinamentos desde à iniciação científica.

Ao Prof. Marcelo Gomes da Silva, pela colaboração nas análises de etileno, e sua equipe, Talita, Sávio e Paulo Sérgio (Belo), pela amizade e incondicional ajuda.

Ao Prof. Fábio Lopes Olivares, pela colaboração nas análises de microscopia óptica e a Rosane Mota Costa, pelos ensinamentos no preparo de amostras e amizade.

Aos professores Regina Celi Cavestré Coneglian, Ângela Pierre Vitória e Marcelo Gomes da Silva, pelas contribuições e sugestões.

Aos amigos do LMGV, especialmente a Kelly, Geórgia e ao Maximiliano, pelo auxílio no laboratório e na construção dos gráficos da tese.

A todos do LBCT, especialmente a Rosivany, Michelle e Luis César.

À UENF e ao CCTA, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

À FAPERJ, pela concessão da bolsa.

À Empresa Caliman Agrícola S/A, pela disponibilização dos frutos para os experimentos.

A todos que participaram de forma direta ou indireta na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo.....	viii
Abstract	x
1.Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	3
2.1Mamoeiro.....	3
2.1.1 Características físico-químicas do fruto.....	4
2.1.2 Estádio de maturação.....	5
2.2 Distúrbio fisiológico – Gelificação da polpa.....	6
2.2.1 O transporte de solutos através das membranas de células vegetais.....	6
3.Enzimas de transporte nas membranas.....	8
3.1 H ⁺ . ATPase tipo P.....	8
3.2 H ⁺ -ATPase tipo V	9
3.3 H ⁺ -PPase	11
4. Trabalhos.....	13
Caracterização do estágio de desenvolvimento de frutos de mamão 'Golden': relação com a emissão de etileno e a atividade da H ⁺ -ATPase tipo P.....	13
Resumo.....	13
Abstract.....	14
Introdução.....	15
Material e métodos.....	16
Obtenção das Amostras.....	16

Determinação da taxa de emissão de etileno.....	17
Firmeza da polpa.....	18
Determinação do teor de sólidos solúveis totais.....	18
Determinação da acidez total titulável.....	19
Atividade das enzimas H ⁺ -ATPases.....	19
Obtenção das vesículas de plasmalema.....	19
Determinação da atividade hidrolítica da H ⁺ -ATPase tipo P.....	20
Determinação de proteínas.....	21
Resultados e discussão.....	21
Resumo e Conclusões.....	27
Referências Bibliográficas.....	28
O Distúrbio da gelificação da polpa de mamão (<i>Carica papaya</i> L. cv. Golden):	
Aspectos físico-químicos, bioquímicos e anatômicos.....	33
Resumo.....	33
Abstract.....	34
Introdução.....	35
Material e métodos.....	36
Obtenção das Amostras.....	36
Preparo do material para microscopia óptica.....	37
Firmeza da polpa.....	38
Determinação do teor de sólidos solúveis totais.....	38
Determinação da acidez total titulável.....	38
Análise do teor de vitamina C.....	39
Análise enzimática.....	39
Preparação das frações microssomais.....	39
Purificação das vesículas de membrana plasmática e de tonoplasto.....	40
Determinação da atividade hidrolítica das H ⁺ -ATPases e da H ⁺ -PPase.....	41
Determinação do gradiente de prótons das H ⁺ -ATPases e da H ⁺ -PPase.....	41
Determinação de proteínas.....	42
Resultados e discussão.....	43
Resumo e Conclusões.....	52
Referências Bibliográficas.....	52

5. Resumo e Conclusões.....	55
Referências Bibliográficas.....	56
Apêndice.....	69

RESUMO

AZEVEDO, Inga Gonçalves de; M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, julho de 2006, Caracterização das bombas de prótons da polpa de frutos de mamão (*Carica papaya* L.) e relação com a ocorrência do distúrbio da gelificação. Orientador: Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira. Co-orientador: Arnaldo Rocha Façanha.

O Brasil é um dos principais produtores de mamão do mundo, porém o volume de exportação desse fruto não ultrapassa 2% da produção. Isto é resultante de perdas por processos inadequados de manuseio, transporte e armazenamento além de doenças e distúrbios fisiológicos. Estudos têm sido realizados a fim de minimizar tais perdas incluindo aqueles que visam o entendimento dos processos que originam o desenvolvimento dos distúrbios fisiológicos. O presente trabalho teve como objetivos: 1) estudar a fisiologia de frutos de mamão 'Golden' em diferentes estádios de maturação e 2) caracterizar a polpa dos frutos de mamão 'Golden' com o distúrbio fisiológico da gelificação, quanto a alguns aspectos bioquímicos e anatômicos. Os resultados obtidos mostraram que a emissão de etileno foi máxima no 2º dia de armazenamento. No teor de sólidos solúveis totais não foi observada diferença significativa. Na análise da atividade da H⁺-ATPase tipo P, os dados mostram que a hidrólise de ATP pela enzima foi decrescente nos 2 primeiros dias de armazenamento, coincidindo com o pico de emissão de etileno, mostrando um decréscimo de gasto energético principalmente nos primeiros estádios de maturação. O distúrbio da gelificação ocorre no período entre maio e julho e é caracterizado por uma polpa de aspecto

de geléia. As primeiras investigações a respeito do distúrbio caminham no sentido de uma disfunção na capacidade de acumular íons e água intracelular. Foi observado que a polpa de frutos acometidos pela gelificação apresentaram células plasmolisadas e grandes espaços intercelulares. Também foram observados os menores teores de sólidos solúveis totais e vitamina C, por outro lado não foram encontradas diferenças significativas na firmeza e acidez total titulável em relação aos frutos controle. Foi observada uma diminuição da atividade ATPásica das vesículas de plasmalema das células oriundas da polpa gelificada em relação à polpa controle. As bombas de prótons presentes no tonoplasto (H^+ -ATPase e H^+ -PPase) mostraram uma tendência ao aumento da hidrólise dos substratos nas amostras da polpa gelificada. O tecido gelificado apresentou menor capacidade para manter o gradiente de prótons dependente de ATP no tonoplasto. Os resultados sugerem que há uma queda na capacidade de compartimentalização de solutos e retenção de água sinalizada através de um efeito inibitório sobre a H^+ -ATPase no tecido gelificado.

ABSTRACT

AZEVEDO, Inga Gonçalves de; M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, julho de 2006, Characterize of papaya fruit pulp proton pumps (*Carica papaya* L.) and relation with flesh gelling disturbance. Adviser: Jurandi Gonçalves de Oliveira. Co-adviser: Arnaldo Rocha Façanha.

Brazil is one the main papaya producers of the world, however the exportation amount of this not exceed 2% of this production. That is resultant from losses for inadequate handling processes, transport and storage besides illnesses an physiological disturbances. Studies have been realized in order to minimize such losses including those that aim at the understanding of the processes that originate the development of such physiological disturbances. The present work had as objectives: 1) to study the physiology of 'Golden' papaya fruits in different maturation stadiums and 2) to characterize the pulp of 'Golden' papaya fruits with the flesh gelling physiological disturbance, in relation to some anatomical and biochemical aspects. The results achieved had shown that ethylene emission had its maximum at he second day of storage. In the total soluble solids tenor no significant difference was observed. In the analysis of the P type ATP ase activity data show that ATP hydrolysis by the enzyme was decreasing in the first two days of storage, coinciding with the peak of ethylene emission, showing a decrease of energy expense in firt stadiums of maturation. The flesh gelling disturbance occur between may and July and is caraterized by a gelling aspect. The first invertigations regarding the disturbance point towards a dysfunction in the capacity to accumulate K^+ ions and intracellular water. It was observed that the pulp of fruits attacked by flesh gelling had present leaked cells and great intracellular spaces. Lower total soluble solids and vitamin C tenor were also observed, on the

order hand no significant differences in the firmness and total titrable acidity in relation to control fruits were found. A reduction of the ATPase activity on plasma membrane vesicles from cells of flesh gelling pulp in relation to the control pulp cells shown a tendency to increase the substrate hydrolysis in flesh gelling pulp samples. The flesh gelling tissue presented lower capacity to keep the ATP dependent proton gradient in tonoplast. The results suggest that there is a drop in the solute compartmentalization and water retention capacity signaled through an inhibitory effect on the H⁺-ATPase in the flesh gelling tissue.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como o maior produtor de mamão (Martins e Costa, 2003). A cultura está distribuída na maioria dos Estados brasileiros, sendo a Bahia e o Espírito Santo os produtores mais importantes, que juntos respondem por mais de 70% da área cultivada e da produção do país (Agriannual, 2003).

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) pertence à classe não monocotiledônea, à ordem Vidales, à família Caricaceae e ao gênero *Carica*. O fruto de mamão é do tipo baga, possui cavidade central contendo numerosas sementes.

Frutos da cultivar Golden foram selecionados a partir de uma mutação natural de plantas 'Sunrise Solo' que foram introduzidas no país em 1975/76. Essa cultivar é atualmente a de maior aceitação no mercado interno. Entre as vantagens dos frutos produzidos pela cultivar Golden, que a torna, também, a preferida para exportação, estão a sua menor susceptibilidade à Mancha Fisiológica do Mamão e à coloração da casca mais uniforme, resultando em um produto de melhor aparência (Marin et al., 1995; Manica, 1996). Entretanto, a qualidade desses frutos em certas regiões produtoras do Brasil têm sido comprometida devido à ocorrência do distúrbio fisiológico conhecido por gelificação de polpa (Oliveira et al., 2002), cuja causa ainda é desconhecida. As principais investigações a respeito desse distúrbio caminham no sentido de uma disfunção da capacidade de acumular água intracelular (Oliveira et al., 2002), o que, em hipótese, estaria relacionada à atividade das bombas próton-motoras.

As bombas de prótons são complexos protéicos associados às membranas, responsáveis por gerar e manter um gradiente eletroquímico nessas membranas, que potencializa a absorção de íons (K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , etc.) essenciais à planta. As principais enzimas que compõem esses sistemas próton motor são: a) uma H^+ .ATPase do tipo P na plasmalema; b) uma H^+ .ATPase do tipo V e c) uma H^+ .pirofosfatase (H^+ .PPase) no tonoplasto. Essas enzimas são capazes de acoplar a energia química da hidrólise de ATP ou de pirofosfato (PPi) à translocação de prótons do citoplasma para fora da célula ou desse para o interior do vacúolo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mamoeiro

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma planta nativa da América tropical pertencente à divisão *Embryophita siphonogama*, sub-divisão *Angiospermae*, classe das *Dicotyledoneae*, subclasse *Archiclamydae*, ordem *Viodales*, subordem *Caricaceae*, família *Caricaceae*, que compreende 4 gêneros, sendo um deles, o gênero *Carica* (Dantas e Morales, 1996; Dantas e Castro Neto, 2000). A espécie *Carica papaya* L. pode apresentar três tipos de flores que são classificadas como: plantas hermafroditas, femininas e masculinas. As plantas hermafroditas apresentam frutificação contínua, o que favorece altas produções (Ritzinger e Souza, 2000). As plantas hermafroditas podem ser classificadas em dois grupos distintos, o grupo Solo e o grupo Formosa.

Em 1977 ocorreu um grande aumento na produção comercial do mamoeiro com a introdução do mamoeiro do grupo Solo (Martins e da Costa, 2003). Os frutos pertencentes a este grupo são pequenos, de polpa firme, cor vermelha e sabor agradável.

A cultivar 'Golden' pertencente ao Grupo Solo, selecionada em 1993/96 em Linhares, ES, pela Caliman Agrícola S/A. É descrita por Marin e Gomes (2000) como tendo frutos e plantas de coloração verde-clara e acentuadamente aclorofilada. Ainda, possui casca lisa e é considerada tolerante à "Mancha

Fisiológica do Mamão”, o que contribuiu para torná-la a de maior aceitação ao mercado internacional.

A cultivar do grupo Formosa “Tainung 01” é um híbrido F1, procedente da Estação Experimental de Fengshan, Formosa, provavelmente resultante do cruzamento de “Sunrise Solo” com um tipo de mamão da Costa Rica. O fruto é de formato alongado e obovado, pesando em média 900 a 1.200 g. Apresenta coloração da casca verde-claro e polpa de cor vermelho-alaranjada (Marin e Gomes, 2000 b).

2.1.1 Características físico-químicas do fruto

A composição do fruto varia amplamente de acordo com a variedade, com as condições culturais e com o estágio de maturação. O mamão é considerado um fruto climatérico, ou seja, apresenta marcante ascensão da produção de etileno e da taxa respiratória no final do período de maturação, que levam ao completo amadurecimento, mesmo quando separado da planta-mãe. Durante este processo, há um significativo aumento na liberação de CO₂ alcançando um *pico climatérico*. Após esse pico a taxa respiratória decresce iniciando a senescência do fruto. (Martins, 2003).

O teor de sólidos solúveis totais expresso em °Brix (°Brix corresponde à escala de porcentagens de matéria seca nas soluções de sacarose quimicamente puras) é usado, na maioria das vezes, como a principal característica para a determinação da qualidade dos frutos. Frutos de mamão, por exemplo, para exportação, devem apresentar teor de sólidos solúveis de no mínimo 11,5°Brix (Almeida, 2003).

O teor de ácidos orgânicos é baixo em mamões, predominando o ácido málico e o cítrico. A polpa do mamão 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, caracterizando assim, baixa acidez na fruta. O teor de vitamina C na cultivar Solo aumenta à medida que o fruto amadurece (Giovannini et al., 2004); frutos maduros possuem cerca de 60 a 100 mg de ácido ascórbico por 100g de polpa (Almeida, 2003).

Durante a maturação do fruto ocorre a degradação da pectina acarretando na diminuição da firmeza da polpa. A modificação da coloração da casca de verde

para o amarelo é decorrente da degradação da clorofila e a síntese de carotenóides que melhoram a coloração e a qualidade do fruto para o consumidor (Bleinroth e Sigrist, 1989).

2.1.2 Estádio de maturação

Segundo Ritzinger (2000), o ponto de colheita do mamão geralmente é indicado pela coloração da casca do fruto, a descrição de cada estágio de maturação é definida por: estágio 0 (ou verde) – fruto totalmente desenvolvido com casca 100% verde; estágio 1 (ou amadurecendo) – a cor amarela não cobre mais de 15% da superfície da casca, rodeada de verde-claro; estágio 2 (ou $\frac{1}{4}$ maduro) – fruta com até 25% da superfície da casca amarela, rodeada de verde-claro; estágio 3 (ou $\frac{1}{2}$ maduro) – fruta com até 50% da superfície da casca amarela, com áreas próximas em verde-claro; estágio 4 (ou $\frac{3}{4}$ maduro) – fruta com 50% a 75% da superfície amarela com áreas próximas verde-claro; estágio 5 (ou maduro) – fruta com 76% a 100% da superfície da casca amarela. Somente a extremidade do pedúnculo é verde, a partir da área de constrição.

Sendo o estágio de maturação um dos fatores que afetam a qualidade do fruto, vários parâmetros são utilizados para determinar o estágio de maturação em que o fruto se encontra, por exemplo, a firmeza da polpa, o conteúdo de sólidos solúveis totais, entre outros. Para o mamão, uma informação importante para a caracterização do estágio de maturação do fruto é a determinação das taxas de emissão de etileno (C_2H_4) no período pós-colheita, uma vez que se trata de um fruto climatérico.

O etileno é um hormônio vegetal gasoso, que pode ser produzido em quase todas as partes dos vegetais superiores. Embora a taxa de produção dependa do tipo de tecido e do estágio de desenvolvimento, a produção de etileno é expressiva durante a abscisão foliar e a senescência da flor, bem como, durante o amadurecimento dos frutos. O etileno também aumenta quando os tecidos vegetais são atacados por pragas e doenças ou sofrem danos de origem física ou química (Abeles et al., 1992).

2.2 Distúrbio fisiológico – Gelificação da polpa

Distúrbios de ordem fisiológica são alterações que ocorrem em decorrência de modificações no metabolismo ou na estrutura dos tecidos e geralmente estão relacionados a fatores ambientais.

Em pomares da região de Linhares ES, têm sido encontrados frutos de mamão da cultivar “Golden” apresentando problemas que afetam a qualidade dos mesmos. Tais frutos apresentam aspectos típicos de um distúrbio fisiológico. Esse problema, de ocorrência sazonal (nas condições dos pomares de Linhares, ES, entre os meses de abril a julho), se caracteriza pela presença de uma região, na polpa do fruto com aspecto translúcido semelhante, muitas vezes, a uma geléia. A alteração na polpa em estado gelificado evolui no sentido do endocarpo para o epicarpo, semelhante à maturação do fruto. Entretanto, quando se observa um fruto em corte longitudinal, aquele que apresenta gelificação muitas vezes é marcado por uma distribuição desigual de tecido da polpa afetado pelo distúrbio, resultado de uma progressão nem sempre simétrica do distúrbio. Esse padrão de ocorrência da gelificação, além do aspecto da consistência do tecido da polpa mais firme se destaca do padrão de maturação da polpa, não deixando dúvida de que não se trata de uma maturação acelerada do mesocarpo. Outro aspecto característico desse distúrbio é o grande acúmulo de líquido na cavidade das sementes, o qual pode ser verificado no momento em que o fruto é seccionado (Oliveira et al., 2002). Segundo Oliveira et al. (2002/2003), o distúrbio fisiológico da gelificação poderia estar relacionado a uma disfunção celular no processo de acumular água intracelular, o que em hipótese, estaria relacionada à atividade de bombas próton-motoras presentes nas membranas celulares.

2.2.1 O transporte de solutos através das membranas de células vegetais

O movimento de íons através das membranas biológicas (membrana plasmática e de endomembranas de diferentes organelas celulares) é um processo altamente seletivo e fundamental na manutenção da energia celular (Harold, 1986). Este processo é desempenhado por complexos protéicos localizados nas membranas, que podem funcionar como proteínas canais,

proteínas carreadoras (ou transportadoras) ou, ainda, como bombas eletrogênicas. Em resposta à ação destas moléculas, alguns compostos são acumulados na célula a concentrações bem mais elevadas que as encontradas no ambiente externo, enquanto outros são totalmente excluídos (Taiz & Zeiger, 1998).

Os sistemas de transporte, presentes nas membranas biológicas, podem ser classificados em sistemas primários e secundários. Os sistemas primários são constituídos pelas bombas eletrogênicas. Estes são responsáveis pelo estabelecimento de um gradiente eletroquímico gerado ao transportar íons contra um gradiente de concentração, utilizando-se para isso compostos ricos em energia. Já os sistemas secundários, constituídos pelas proteínas canais e as carreadoras ou transportadoras, são capazes de transportar substratos (ATP ou PPI) através da membrana, sem envolver quebra de ligações covalentes. Este processo depende do desequilíbrio de cargas, gerado na membrana, pelos sistemas primários (Logan et al., 1997).

As proteínas canais, enquanto no estado “aberto”, comportam-se como poros seletivos através dos quais é permitida a passagem de substratos específicos sem que ocorram alterações morfológicas na proteína. Várias classes de proteínas canais têm sido descritas nos sistemas vegetais, incluindo as específicas para K^+ , Ca^{++} e ânions. Nestas, o gradiente elétrico determinará a direção e extensão do fluxo passivo de íons (Sze et al., 1999).

Com relação às proteínas transportadoras, estas sofrem um ciclo de alterações conformacionais, que acompanham o percurso da molécula ou íon através das mesmas (Logan et al., 1997).

O transporte mediado pelas proteínas canais e certas proteínas transportadoras, as “uniporters”, ocorre a favor do gradiente eletroquímico. Por outro lado, as co-transportadoras - “symporters” e “antiporters” - conseguem mover seus substratos tanto a favor como contra um gradiente de potencial elétrico, acoplando esse transporte ao de outro substrato que se movimenta a favor do gradiente, respectivamente. Esses sistemas de transporte dependem dos principais nutrientes para o funcionamento da célula vegetal (Façanha & de Meis, 1998).

As adenosinas 5`-trifosfatases são complexos protéicos responsáveis pela movimentação de prótons através de membranas, denominadas bombas de

prótons (H^+ -ATPases). Essas enzimas são responsáveis pela interconversão de energia química, elétrica e luminosa nas células de todos os organismos vivos. Elas acoplam a hidrólise de ATP ao transporte de prótons em membranas de células vegetais, gerando uma diferença de potencial eletroquímico, requerido para o transporte secundário, o qual é completamente dependente da força motriz de prótons (FPM). A quantificação da FPM pode ser usada para estimar a energia livre contida no potencial de prótons. Este potencial é criado, através da membrana, por um bombeamento de prótons executado pelas H^+ -ATPases (próton ATPase) e H^+ -PPases (próton pirofosfatase) (Sanders & Bethke, 2000).

3. Enzimas de transporte nas membranas

Os principais sistemas de transporte de prótons que operam nas células vegetais são as H^+ -ATPases do tipo P (localizada na membrana plasmática), H^+ -ATPases do tipo V e as H^+ -PPases ambas localizadas no tonoplasto.

3.1 H^+ ATPase tipo P

A H^+ ATPase presente na membrana plasmática das plantas desempenha a função de transportar íons e moléculas por meio de transporte ativo, através de gradiente de pH e potencial elétrico. Esta enzima utiliza ATP como substrato para bombear prótons através da membrana plasmática para o apoplasto. Sendo constituída por uma cadeia polipeptídica de aproximadamente 100 kDa podendo formar dímeros. O monômero tem 10 domínios transmembranares e uma alça hidrofílica contendo a região de ligação do ATP (Sze et al., 1999) (Figura 1). As H^+ ATPases formam um gradiente de pH e um potencial elétrico através da membrana. Com isso, exercem funções tais como a acidificação da parede celular, induzindo a plasticidade da mesma e possibilitando a expansão celular. Também são essenciais na remoção de H^+ do citoplasma. A alcalinização do citoplasma talvez seja um dos fatores disparadores da divisão celular (Serrano, 1989).

As ATPases tipo P são divididas em 5 grupos, baseando-se na seletividade dos íons que transportam. As P_1 -ATPases estão envolvidas no transporte de metais pesados como Cd^{2+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} ; as P_2 -ATPases transportam vários cátions monovalentes e bivalentes incluindo, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} ; as P_3 -ATPases transportam H^+ ; e as P_4 -ATPases foram identificadas em leveduras e

provavelmente transportam aminofosfolipídeos (Catty et al., 1997). A ATPase Cta4, necessária para o controle da morfologia celular e da dinâmica dos microtúbulos em *Saccharomyces pombe* e a ATPase Cód1p/Spf1p de *Saccharomyces cerevisiae*, que estão localizadas no retículo endoplasmático, são classificadas como sendo as do tipo P₅-ATPases (Catty et al., 1997; Cronin et al., 2002; Okorokova-Façanha et al., 2002).

As H⁺-ATPases tipo P são reguladas pela concentração de substrato (ATP), pH e temperatura (Sze et al., 1999). As H⁺-ATPases podem ser ativadas ou desativadas em resposta à luz, hormônios, ataque de patógenos, dentre outros (Dietz et al., 2001). Este tipo de regulação é mediado por um especializado domínio, auto-inibitório, da região C-terminal da cadeia polipeptídica, o qual age como uma válvula regulando a atividade da bomba de prótons (Taiz & Zeiger, 1998). As ATPases de membrana plasmática são inibidas por ortovanadato (H₂VO₄⁻) que compete com o fosfato (Sze et al., 1999) e por complexos de fluoreto de alumínio (Façanha e De Meis, 1995).

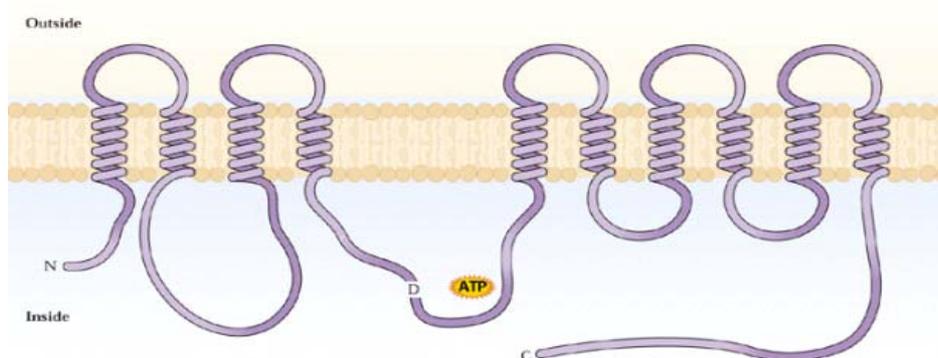


Figura 1: Modelo estrutural da H⁺-ATPase da membrana plasmática. Fonte: Buchanan et al. (2000).

3.2 H⁺-ATPase tipo V

As ATPases tipo V (V₁V₀ H⁺-ATPase) estão presentes em diversas endomembranas de todas as células eucarióticas (membranas vacuolares, membranas plasmáticas de células vegetais, membranas lisossomais, membranas endossomais, membranas de grânulos secretórios) (Figura 2). O sítio catalítico da V₁ V₀ ATPase é acessível ao ATP-Mg²⁺, substrato que é impermeável à membrana (Lida et al., 1990). Essas ATPases formam um

complexo, de múltiplas subunidades, com massa molecular maior que 700 KDa (Bowman & Bowman, 1986; Pedersen & Carafoli, 1987).

A configuração básica da porção periférica consiste em três cópias da subunidade catalítica **A**, onde se situam os sítios de ligação de ATP (Nelson e Taiz, 1989), intercaladas por três cópias da subunidade **B**, subunidade não-catalítica de ligação do substrato (Ratajczak, 2000). As subunidades **A** e **B** apresentam semelhanças estruturais com as subunidades β e α , respectivamente, da ATPase do tilacóide e da membrana mitocondrial. As subunidades **D** e **G** participam no acoplamento da hidrólise de ATP e no transporte de H^+ (Ratajczak, 2000), enquanto as subunidades **F** e **E** parecem estar envolvidas na conexão dos setores V_0 e V_1 , mantendo a estabilidade estrutural da enzima (Tomashek et al., 1997). A subunidade **C** é um peptídeo altamente hidrofóbico, contendo quatro domínios expandidos na membrana (Ratajczak, 2000) e parece estar envolvida diretamente na translocação de H^+ .

A ATPase tipo V possui semelhanças significativas com a $F_1 F_0$ -ATPase, que é encontrada nas membranas tilacóides dos cloroplastos (chamada de $C_1 C_0$), na membrana interna da mitocôndria e também na membrana de bactérias. A ATPase tipo F é responsável pela síntese de ATP e possui pH ótimo entre 8.0 e 9.0. É inibida pela oligomicina (inibidor da porção F_0) e pela azida. (Cridler et al., 1994).

As V-ATPases são estimuladas por ânions (por exemplo, cloreto) podendo ser inibidas por bafilomicina A - um inibidor específico e potente de ATPase tipo V, que previne a formação do ΔpH vacuolar (Bowman et al., 1988) – e por nitrato (Bowman & Bowman, 1986; Pedersen & Carafoli, 1987). As V-ATPases também são insensíveis a ortovanadato, oligomicina e fluoroaluminatos, que inibem as atividades da F-ATPase (Bowman, 1983; Bowman & Bowman, 1986; Perzov et al., 2001). O ADP também pode ser inibidor dessa enzima por competição com o ATP pelo sítio catalítico da mesma. As ATPases tipo V possuem capacidade de hidrolisar diferentes nucleotídeos tais como, GTP e ITP e em menor extensão UTP e CTP (Kakinuma et al., 1981).

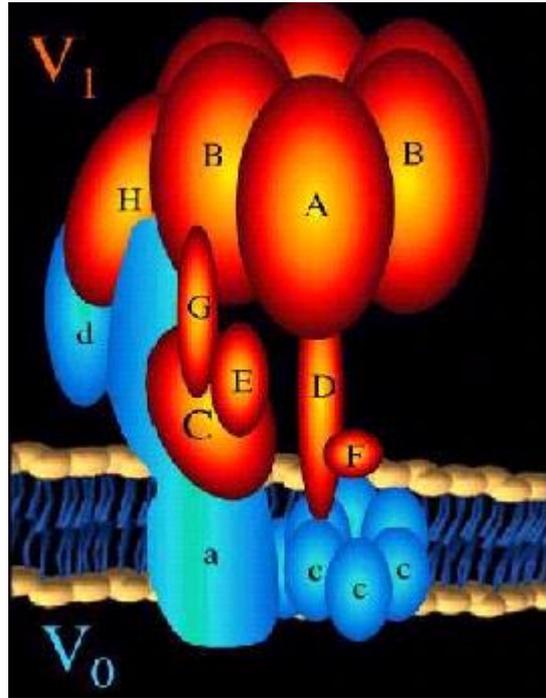


Figura 2: Modelo estrutural da H^+ -ATPase de tonoplasto. Fonte: (uni-tuebingen, 2003)

3.3 H^+ -PPase

A H^+ .PPase está distribuída em vegetais superiores, algas e na bactéria fotossintética *Rhodospirillum rubrum* (Rea et al., 1992), e mais recentemente também foi descrita em protistas (Scott et al., 1998) (Figura 3).

A H^+ .PPase tem um papel vital no metabolismo energético, pois o pirofosfato (PP_i) é um sub-produto natural de várias reações biossintéticas (Buchanan et al., 2000). A hidrólise de PP_i , por PPases, favorece estas polimerizações biossintéticas ao diminuir a concentração citoplasmática deste produto. Existem várias PPases, como enzimas solúveis no citoplasma e em sub-compartimentos celulares, associadas a membranas de bactérias fotossintéticas, à membrana interna mitocondrial (enzima monomérica de 33 kDa) e à membrana vacuolar (tonoplasto) (Jiang et al., 1997).

A H^+ .PPase de tonoplasto, que é uma enzima transportadora de prótons, é composta por um polipeptídeo de 73 kDa e possui aproximadamente 770 resíduos de aminoácidos (Maeshima, 1990; Sato et al., 1991). O pH ótimo desta

enzima varia de 7.0 a 8.0 e tem como substrato o pirofosfato (Maeshima, 2000). Esta enzima também está envolvida na acidificação do vacúolo (Baltscheffsky et al., 1999).

Esta enzima não possui inibidores específicos, mas é sensível a altas concentrações de vanadato e fluoreto (Maeshima & Yoshida, 1989) e a baixas concentrações de pirofosfato inorgânico (Zhen et al., 1994). A H^+ -PPase possui 13 domínios transmembranares e seu sítio catalítico localiza-se em uma alça citoplasmática, que apresenta dez resíduos de aminoácidos carregados negativamente (Takasu et al., 1997). Estes aminoácidos facilitam sua ligação ao complexo Mg^{2+} - PP_i (Takasu et al., 1997). A maior característica da H^+ -PPase é seu requerimento por cátions monovalentes como K^+ , Rb^+ , NH_4^+ , Cs^+ , Na^+ , Li^+ (Rea et al., 1992).

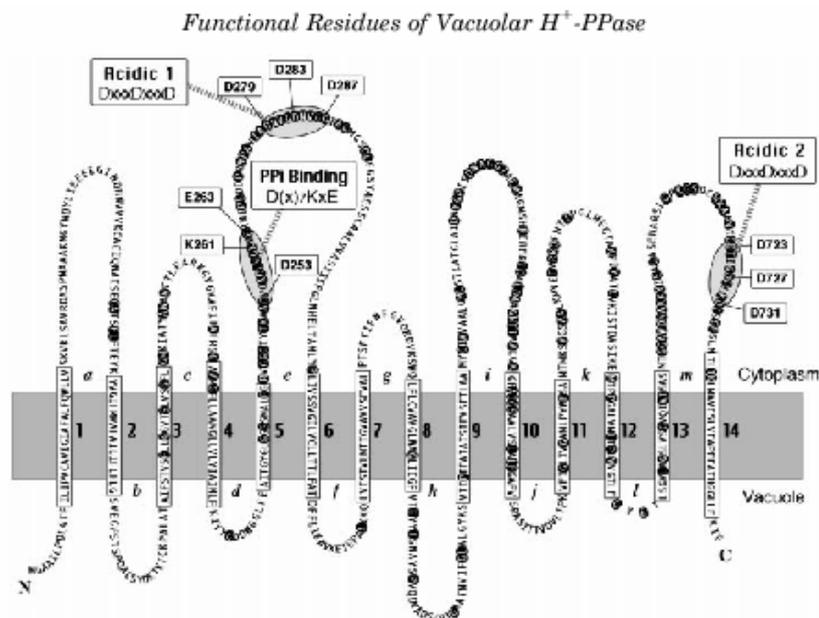


Figura 3: Modelo estrutural da H^+ -PPase de tonoplasto. Fonte: Maeshima, 2000

4. TRABALHOS

CARACTERIZAÇÃO DO ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DE MAMÃO 'GOLDEN': RELAÇÃO COM A EMISSÃO DE ETILENO E A ATIVIDADE DA H⁺-ATPASE TIPO P

RESUMO

O etileno é um hormônio vegetal importante no processo de amadurecimento de frutos. Sendo o mamão um fruto climatérico, isto é, apresenta liberações crescentes de etileno durante seu amadurecimento, o pico de emissão desse gás é um ponto de referência da maturidade fisiológica do fruto. Alguns processos relacionados ao período de amadurecimento como a homeostase iônica na polpa de frutos ainda é pouco conhecida. A enzima H⁺-ATPase gera um gradiente eletroquímico através da plasmalema, potencializando a absorção de importantes íons essenciais à célula, sendo relacionado com a homeostase celular durante o amadurecimento do fruto. No presente trabalho foram utilizados frutos de mamão da cultivar Golden, preferida para exportação por uma maior

comercialização, com o objetivo de investigar a atividade da enzima H^+ -ATPase tipo P (plasmalema) extraída da polpa dos frutos em diferentes estádios de maturação. O estágio de desenvolvimento dos frutos foi acompanhado e caracterizado a partir da emissão de etileno e das variáveis físicas e químicas como firmeza, teor de sólidos solúveis totais e acidez titulável da polpa. Os resultados mostram que a emissão de etileno apresentou um pico no 2º dia de armazenamento. A firmeza da polpa foi decrescente à medida que os frutos avançaram na maturação, mostrando a influência do etileno na atividade das enzimas de pectico-hidrolíticas. Com relação ao teor de sólidos solúveis totais não foi observada diferença significativa durante o tempo de armazenamento. Também foi observado uma diminuição na acidez total titulável com a maturação dos frutos. Na análise de hidrólise de ATP pela enzima H^+ -ATPase tipo P foi observada uma diminuição proeminente nos 2 primeiros dias de armazenamento, que coincide com o pico de emissão de etileno, mostrando um decréscimo de gasto energético principalmente nos primeiros estádios de maturação. Isto pode estar relacionado a um menor transporte de solutos para o citosol celular nestes estádios de maturação.

ABSTRACT

Ethylene is an important vegetal hormone in the maturation process of fruits. Being papaya a climateric fruit, which is one that presents increasing ethylene releases during its maturation, the maximum emission of this gas is a control point for the fruit physiological maturity. Some processes related with the maturation period as ion homeostasis in the pulp of fruits are still little known. The H^+ -ATPase enzyme generates an electrochemical gradient through the plasma membrane powering the absorption of important ions that are essential to the cell and related with the cellular homostasis during the maturation of the fruit. In the present work papaya fruits from the Golden cultivar, which has been preferably

cultivated for exportation because it is more comercialized, were utilized with the objective to investigate the activity of the P type (plasma membrane) H^+ -ATPase enzyme extracted from the pulp of fruits in different maturation stadiums. The development stadium of the fruits was accompanied and characterized by the emission of ethylene and by the physico and chemical variables such as firmness, total solid soluble tenor and titratable acidity of the pulp. The results has shown that ethylene emission presented its peak at the second day of storage. The firmness of the pulp decreased as the fruits advanced in maturation, possibly an ethylene influence on the activity of peptic-hydrolytic enzymes. In relation to the total solid soluble tenor no significant difference during the storage time was observed. A fall in the total titratable acidity was also observed along the fruit maturation. In the P type H^+ -ATPase mediated ATP hydrolysis analysis a prominent fall in the two first days of storage was observed coinciding with the peak of ethylene emission, showing a decrease in energy expense mainly during the earlier maturation stadiums. This can be related to the fewer solute transportation into the cell citosol in these maturation stadiums.

INTRODUÇÃO

O etileno é um hormônio vegetal gasoso importante em todo o desenvolvimento do fruto, principalmente na fase de amadurecimento (Kays, 1994). O mamão é um fruto climatérico apresentando um pico de liberação de etileno característico durante seu amadurecimento (Silva et al., 2005) e este pico serve como ponto de referência da maturidade fisiológica do fruto. Dada a importância do climatérico na fase de amadurecimento dos frutos, é importante que os eventos associados a esta fase sejam melhores esclarecidos e caracterizados em frutos tropicais. Neste trabalho foram investigados aspectos fisiológicos e bioquímicos durante o amadurecimento de frutos de mamão visando oferecer fundamentos científicos sobre o período de pós-colheita. Foram

utilizados frutos da seleção 'Golden' originária de uma mutação natural de plantas "Sunrise Solo". Entre as vantagens dos frutos produzidos pela seleção 'Golden' que a torna preferida para exportação estão: a sua menor susceptibilidade à Mancha Fisiológica do Mamão e o amarelecimento da casca mais uniforme (Marin et al., 1995; Manica, 1996).

O conhecimento do metabolismo celular e o sistema de transporte de íons para a célula durante o período de amadurecimento dos frutos ainda são pouco conhecidos. A enzima H^+ -ATPase gera um gradiente eletroquímico através da membrana plasmática, potencializando a absorção de importantes íons (K^+ , Mg^{++} , PO_4^- etc.) essenciais em diversos eventos metabólicos como expansão celular, integridade de membrana (Taiz e Zeiger, 2004; Morsomme e Boutry, 2000), o que está relacionado à homeostase celular durante o desenvolvimento do fruto.

Neste trabalho avaliou-se a atividade da enzima H^+ -ATPase tipo P (plasmalema) extraída de polpa de mamão, 'Golden', em diferentes estádios de maturação caracterizados pela emissão de etileno e de variáveis como a firmeza da polpa, o teor de sólidos solúveis totais e a acidez total titulável da polpa dos frutos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das Amostras

Foram utilizados frutos de mamão 'Golden' dos pomares pertencentes à região de Linhares, ES, localizada na latitude 19°15' S e longitude de 39°51' O. A região produtora apresenta temperaturas máximas entre 30°C e 32°C e mínimas entre 15°C e 18°C (INCAPER-ES). Os frutos, após tratamento hidrotérmico (48 °C e 8 °C por 20 minutos) e acondicionamento em caixas de papelão para exportação, foram transportados sob refrigeração (15 °C) até o Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal onde foram realizados os ensaios.

No ensaio foram analisados 3 frutos, representando 3 repetições para cada estágio de maturação. Foram amostrados frutos em 5 estádios distintos de maturação, desde o fruto verde-maduro, estágio 1, até o fruto totalmente maduro, estágio 5. Segundo Ritzinger (2000), o ponto de colheita do mamão geralmente é indicado pela coloração da casca do fruto, a descrição de cada estágio de maturação é definida por: estágio 0 (ou verde) – fruto totalmente desenvolvido com casca 100% verde; estágio 1 (ou amadurecendo) – a cor amarela não cobre mais de 15% da superfície da casca, rodeada de verde-claro; estágio 2 (ou ¼ maduro) – fruta com até 25% da superfície da casca amarela, rodeada de verde-claro; estágio 3 (ou ½ maduro) – fruta com até 50% da superfície da casca amarela, com áreas próximas em verde-claro; estágio 4 (ou ¾ maduro) – fruta com 50% a 75% da superfície amarela com áreas próximas verde-claro; estágio 5 (ou maduro) – fruta com 76% a 100% da superfície da casca amarela.

Determinação da taxa de emissão de etileno

Para detecção da emissão de etileno (C_2H_4) pelos frutos foi utilizado um espectrômetro fotoacústico que possui a sua célula fotoacústica no interior da cavidade de um laser CO_2 . No espectrômetro fotoacústico, mudanças de pressão são detectadas por um microfone no interior de um tubo ressonador da célula fotoacústica através do qual flui a amostra de ar que contém as moléculas sob investigação; o sinal acústico é produzido pela flutuação periódica de pressão, a uma frequência de ressonância de 1600 Hz, devido à modulação do laser de excitação. O sinal fotoacústico (S) gerado dentro da cavidade da célula fotoacústica depende da constante de absorção (α) e da concentração (Conc.) do gás, bem como da potência do LASER (P) e da geometria da célula fotoacústica (Cell-ID):

$$S = P \times \text{Cell-ID} \times \alpha \times \text{Conc.} \quad (\text{Eq. 1})$$

A potência dentro da cavidade óptica do LASER pode atingir cerca de 100W, operando geralmente entre 50W e 80W. O emprego da espectroscopia fotoacústica aumenta bastante a sensibilidade na detecção de gases numa comparação com a cromatografia gasosa. Dentro da região espectral do

infravermelho, o espectro de muitas moléculas, como o etileno, apresenta-se como uma “impressão digital” única, o que permite a quantificação de etileno na faixa de 300 ppt. O instrumento de fotoacústica utilizado nesse trabalho foi desenvolvido na Universidade de Nijmegen ,especificamente para aplicações biológicas (Voeselek et al.,1997).

Os frutos foram colocados um por vez, durante 45 minutos, em uma câmara hermeticamente fechada, onde o etileno emitido foi transferido continuamente para a célula fotoacústica usando ar ambiente como gás de arraste a um fluxo constante de 2 Lh^{-1} , ajustado através de controladores eletrônicos. Hidrocarbonetos do gás de arraste (ar) são removidos antes de passar pela câmara porta-amostra, por meio de catalisador. Na saída da câmara, filtros contendo KOH e CaCl_2 são empregados para eliminar CO_2 e água, respectivamente, presentes no gás de análise. Finalmente, antes de entrar na célula fotoacústica, o gás de análise passa através de uma armadilha de N_2 líquido para evitar a interferência de gases, hidrocarbonetos de alto peso molecular e etanol. Após a passagem pela célula fotoacústica o gás de amostra é eliminado para o ambiente. O sistema é calibrado usando uma amostra de etileno sintético, padrão comercial, na concentração de 1 ppm. Os resultados obtidos foram expressos em $\mu\text{Lh}^{-1} \text{ kg}^{-1}$.

Firmeza da polpa

Para a medição da firmeza na polpa, cada fruto foi dividido ao meio, no sentido longitudinal, resultando em duas faces. A firmeza foi determinada em três pontos equidistantes de cada face dos frutos e distanciados da casca de 0,5 cm, por meio da resistência à penetração na polpa. Para tal foi utilizado um penetrômetro de bancada (modelo 53205; Fruit Pressure Tester, Italy) com adaptador de 8,0 x 8,0 mm (altura x diâmetro). Os resultados foram expressos em Newton (N).

Determinação do teor de sólidos solúveis totais

O teor de sólidos solúveis contidos na polpa do mamão foi determinado utilizando duas gotas do suco extraído de uma amostra da polpa do fruto, de

cerca de 2 g, que foi colocado sobre o prisma do refratômetro portátil (Atago N1) e os resultados expressos em °Brix.

Determinação da acidez total titulável

Para determinar a acidez total titulável da polpa dos frutos foi empregado o método N° 22.058 descrito pela A.O.A.C. (1970) com concentração de álcali de 0,1N de NaOH. Em função da polpa dos frutos de mamão possuir coloração que possa ser confundida com a cor rósea indicada pela fenolftaleína, utilizou-se o valor de pH 8,2 para determinar o ponto final da titulação. Para efetuar essa análise, cerca de 30 g de tecido da polpa foi retirado da região mediana dos frutos, e homogeneizado em 50 mL de água destilada. As amostras assim preparadas foram tituladas com a solução padronizada de NaOH 0,1N. Os resultados foram expressos em percentagem de ácido cítrico, sendo obtidos através da seguinte expressão matemática:

$$\text{ATT (\% em ácido cítrico)} = \frac{\text{volume de NaOH (mL)} \times \text{N do NaOH} \times \text{grama do ácido cítrico} \times f}{\text{Massa da amostra (g)}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Massa da amostra (g)

Em que:

N = normalidade da base;

Equivalente grama do ácido cítrico = 64;

f = fator de correção da base

Atividade das enzimas H⁺-ATPases

Obtenção das vesículas de plasmalema

Vesículas de plasmalema com as enzimas H⁺-ATPases foram isoladas a partir da polpa de frutos de mamão. Para tanto foi utilizado o processo de centrifugação diferencial - descrito por Giannini & Briskin (1987), com modificações.

Após serem pesadas, as amostras de tecido da polpa foram homogeneizadas em meio tamponado, utilizando um volume de tampão proporcional (1:1) à quantidade de material fresco. A homogeneização foi realizada em gral utilizando um pistilo, sendo todo o procedimento conduzido sob banho de gelo.

A composição e concentração final dos reagentes no tampão de extração foram as seguintes: 500 mM Sacarose, 30% (v/v) Glicerol, 210 mM tampão Tris pH 8,0, 100 mM KCl e 15 mM EDTA, 2 mM PMSF, 2 mM Benzamidina, 10 mM DTT, 0,4% BSA (p/v) e 0,3% PVPP (p/v). O material homogeneizado foi filtrado em 4 camadas de gaze e submetido à primeira centrifugação (centrífuga HITACHI, himac CP) a 1.500 x g por 15 min para a remoção de células não rompidas e núcleos. O sobrenadante então foi coletado e submetido a uma nova centrifugação (ultra-centrífuga HITACHI, himac CP 85 β) a 21.000 x g por 10 min para a remoção de mitocôndrias. O sobrenadante, finalmente, foi centrifugado a 100.000 x g por 35 min, onde o precipitado foi suspenso em solução tampão contendo: glicerol 15%, Tris-HCl 70 mM (pH 7,6), 1mM EDTA, 1 mM DTT, PMSF 1 mM e 1 mM Benzamidina, obtendo-se as vesículas de plasmalema.

Determinação da atividade hidrolítica da H⁺-ATPase tipo P

Após a obtenção das vesículas de plasmalema descritas no item anterior. A atividade H⁺-ATPásica foi determinada pelo método descrito por Fiske & Subbarow (1925). A metodologia consiste na dosagem colorimétrica de fosfato inorgânico (P_i) liberado durante a hidrólise enzimática de ATP. A reação foi iniciada com a adição das vesículas ao meio de reação e interrompida pela adição de ácido tricloroacético (TCA) numa concentração final de 5%.

A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-120) no comprimento de onda de 750 nm. A constituição e concentração final dos reagentes no meio de reação para atividade ATPásica foram as seguintes: 50 mM Tris-HCl pH 6,5; 3 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 1 mM ATP e 0,06 mg.mL⁻¹ de proteína.

A hidrólise de ATP foi representada como atividade sensível ao inibidor específico, ou seja: atividade total subtraída da atividade inibida por 0,2 mM de ortovanadato de sódio.

Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas foi determinada em espectrofotometria a 595 nm (espectrofotômetro SHIMADZU UV-120) - como descrito por Bradford (1976) - utilizando BSA como proteína padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise da taxa de emissão de etileno foi observado um pico de emissão do hormônio no 2º dia de armazenamento (Figura 1), indicando que o fruto entrara no climatérico. O aumento da taxa respiratória (climatérico) é um evento secundário e dependente dos níveis disponíveis de etileno (Chitarra e Chitarra, 2005a). Segundo Rhodes (1970), o climatérico pode ser definido como um período da ontogenia de certos frutos, durante o qual mudanças bioquímicas são iniciadas pela produção de etileno, marcando a transição entre a maturação e a senescência dos frutos climatéricos, com aumentos marcantes na atividade respiratória e condução ao amadurecimento. As etapas finais do desenvolvimento dos frutos podem ser classificadas em estádios de maturação (Ritzinger, 2000). Para caracterizar o padrão de amadurecimento de um fruto são utilizados vários fatores (físicos, químicos e bioquímicos, dentre outros) que estabelecem cada estágio, entretanto dentre estes fatores a taxa de emissão de etileno é determinante para a identificação do climatérico (Saltveit, 1999).

Outra variável muito empregada na caracterização dos estádios de maturação em frutos de mamão é a firmeza da polpa (Chitarra e Chitarra, 2005b), um importante atributo de qualidade das frutas (Souza, 1998 a). A figura 2 mostra que a firmeza da polpa dos frutos decresceu drasticamente no período de 0 a 2 dias, coincidindo com o pico de emissão de etileno (Figura 1).

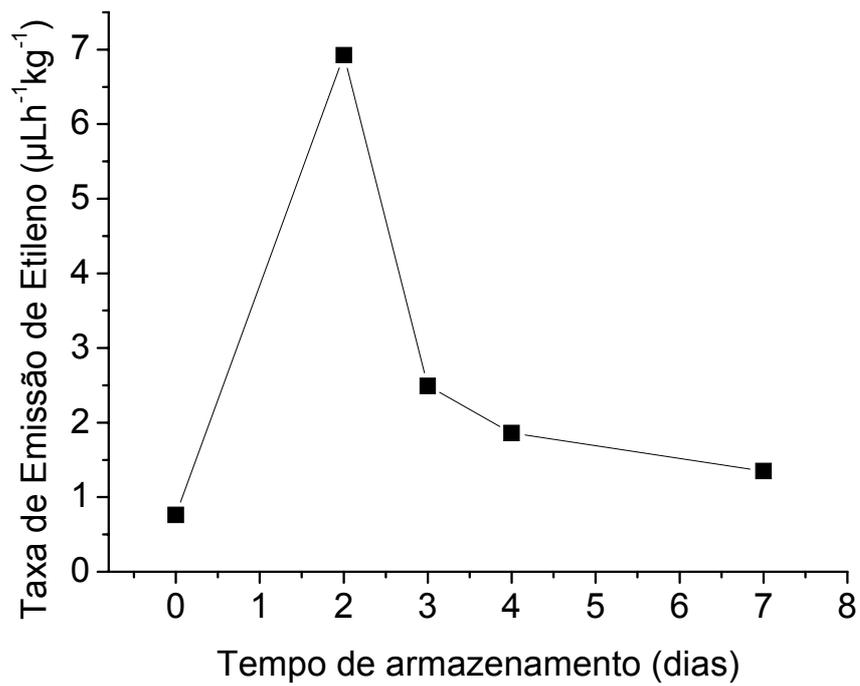


Figura 1 – Taxa de emissão de etileno em frutos de mamão, ‘Golden’, em diferentes dias de armazenamento. Os dados são apresentados como uma média de 3 repetições.

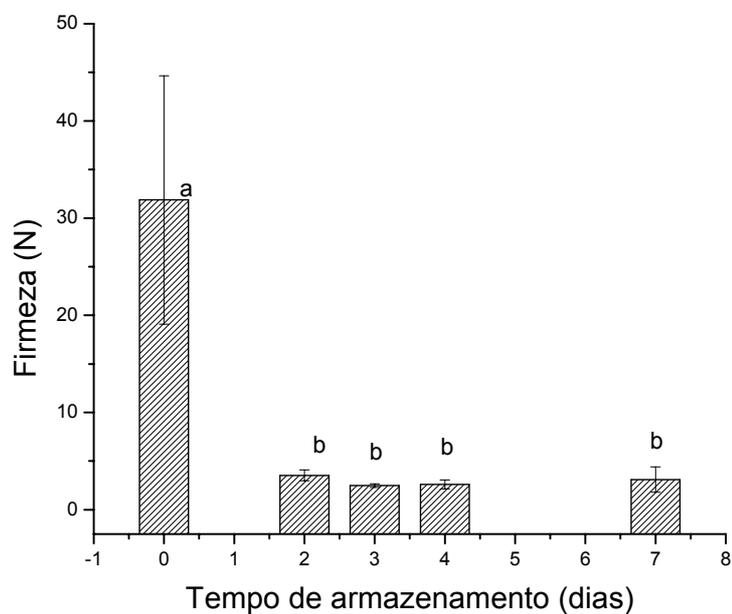


Figura 2 - Avaliação da firmeza da polpa em frutos de mamão em diferentes estádios de maturação. A significância entre os dias foi determinada por análise de variância seguida do teste Tukey 5%.

A associação entre a perda de firmeza e a emissão de etileno tem sido freqüentemente destacada como uma das influências do etileno sobre a firmeza do fruto (Abeles et al., 1992; Hiwasa et al., 2003). Para Abeles et al. (1992) o etileno seria o responsável apenas pelo desencadeamento do processo de maturação, que seguiria com todos os eventos a ele associados, inclusive as mudanças na textura, através de uma seqüência de eventos precisamente controlados. Outros autores como Hiwasa et al. (2003) creditam ao etileno não só a inicialização do processo de amaciamento da polpa, mas sim toda a evolução desse processo.

O amaciamento da polpa de mamão ocorre no sentido do endocarpo para o epicarpo e da região distal para a proximal (Silva, 1995). Paull e Chen (1983) mostraram que o amolecimento da polpa do mamão é resultado da ação enzimática sobre compostos da parede celular, sendo a poligalacturonase (PG) (EC. 3.2.1.15) e a pectinametilesterase (PME) (EC. 3.2.1.11) as principais enzimas cuja ativação acompanha o pico climatérico do fruto. Silva et al. (2004) observaram que a atividade da enzima PG está diretamente relacionada à intensa redução da firmeza que ocorre no início do amadurecimento em frutos de mamão 'Golden'.

O teor de sólidos solúveis totais (SST) fornece uma estimativa da proporção de açúcares solúveis contidos na polpa do fruto. Os resultados aqui apresentados mostram que não foi observada diferença significativa no teor de SST durante o tempo de armazenamento dos frutos (Figura 3). Em média, o teor de SST dos frutos foi de 10,4 °Brix, um pouco abaixo do que preconiza Bleinroth (1995) que recomenda que o mamão, em geral, deva ser colhido quando o teor de SST da polpa atingir pelo menos 11,5 °Brix. O teor de SST é um atributo de qualidade muito sujeito à variações, assim, o estabelecimento de um intervalo de SST que represente um estágio de maturação não é uma tarefa das mais fáceis. Não foi observada variação significativa, no teor de SST nos frutos de mamão em relação ao estágio de maturação dos mesmos, diferentemente do que foi verificado por Souza (1998b). Este autor observou efeito significativo do estágio de maturação no teor de SST em frutos de mamão 'Santa Bárbara', entretanto, o aumento nos teores de SST ao longo do amadurecimento do mamão é questionável, visto que o mesmo possui apenas traços de amido, quando destacado da planta-mãe (Calegario, 1997), o que não suportaria variações na

concentração de açúcares solúveis. Giovannini et al. (2004), trabalhando com a cultivar Golden encontraram valores médios de 12,30; 10,60 e 9,95 °Brix em frutos de mamão 'Golden', colhidos nos meses de janeiro, agosto e outubro, respectivamente. Esses dados mostram um padrão sazonal no acúmulo de SST em função do período de desenvolvimento dos frutos. Gomes Filho (2005) também observou o mesmo padrão sazonal na concentração de SST da polpa de frutos de mamão 'Golden'. Segundo este autor, o maior acúmulo de SST no final da estação do verão se deve aos altos índices pluviométricos e às elevadas médias de temperatura desse período. Tais fatores resultariam em um aumento, de modo geral, da taxa metabólica da planta (incluindo a atividade fotossintética da planta e o transporte de açúcares para os frutos), o que proporcionaria maiores acúmulos de açúcares pelos frutos desenvolvidos no verão.

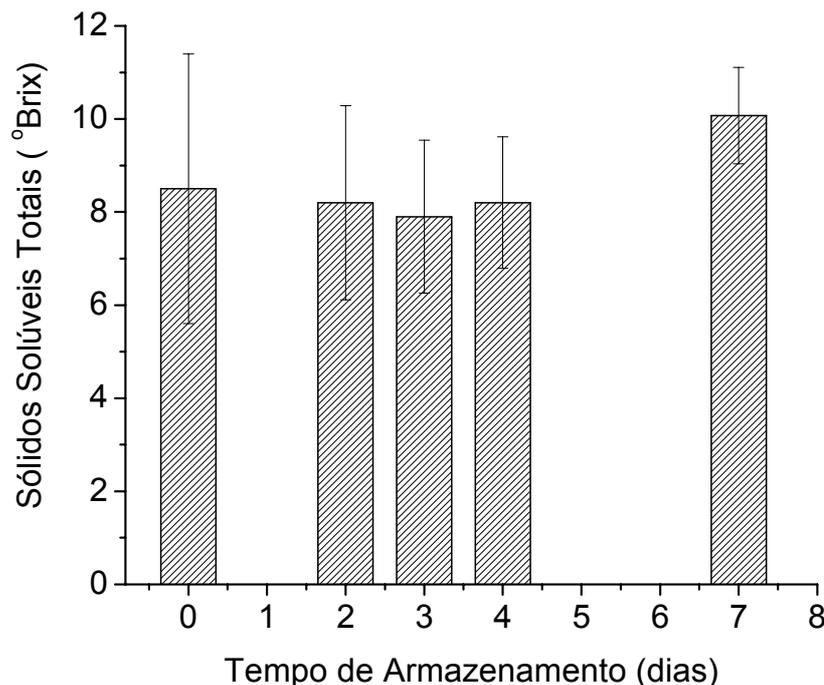


Figura 3 - Teor de sólidos solúveis totais em frutos de mamão 'Golden' em diferentes dias de armazenamento. Teste de análise de variância não significativo.

Ainda de acordo com Gomes Filho (2005), os frutos que se desenvolveram na estação do outono, onde as temperaturas médias já se encontravam em declínio, acumularam menos SST (11,66 °Brix em maio) que os frutos do verão

(12,27 °Brix em fevereiro), mas ainda acima dos níveis encontrados nos frutos desenvolvidos no inverno (9,33°Brix em setembro).

A acidez total titulável (ATT) mostrou uma diminuição significativa entre os dias 0 e 2, coincidente com o pico climatérico, seguido de outra diminuição ($P < 0,05$) nesta variável de qualidade, entre os dias 2 e 3, não sendo observada diferença significativa a partir do terceiro dia de armazenamento dos frutos (Figura

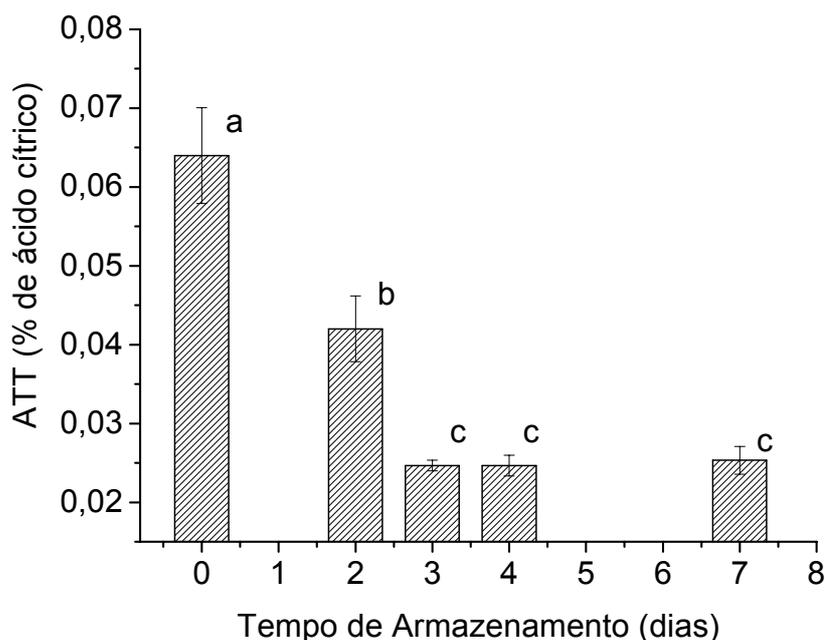


Figura 4 - Acidez total titulável em frutos de mamão 'Golden' em diferentes dias de armazenamento. A significância entre os dias foi determinada por teste de análise de variância seguida do teste Tukey 5%.

Os valores médios observados variaram de 0,064 a 0,024% de ácido cítrico. O mamão é um fruto de baixa acidez apresentando valores menores que 0,3% de ácido cítrico (Martins e Costa, 2003). As mudanças na ATT em frutos de mamão, bem como em outras espécies, durante o amadurecimento dos mesmos têm sido relatadas como bastante variável. Mosca (1992) descreve que a ATT no mamão (*Improved Sunrise Solo Line 72/12*) decresceu inicialmente seguido de uma subida no final da maturação dos frutos mantidos sob temperatura ambiente. Por outro lado, Draetta et al. (1975) relatam um aumento da acidez titulável até 72 horas após a colheita do fruto e relacionam esta variação à provável formação de ácido galacturônico como consequência da hidrólise da pectina pela

pectinametilsterase. Souza (1998) citou que os ácidos orgânicos geralmente diminuem com a maturação, em decorrência do processo respiratório ou de sua conversão em açúcares. Portanto, a concentração desses ácidos varia de acordo com a espécie, cultivar e geralmente ocorre a sua diminuição com o amadurecimento da fruta. Gamarra Rojas e Medina (1996) observaram em frutos de maracujá amarelo que durante o amadurecimento dos mesmos houve um acúmulo de ácidos orgânicos seguidos por uma diminuição dos mesmos. Esses autores atribuem essa mudança à utilização desses ácidos como importantes fontes de energia respiratória, onde os mesmos são convertidos ou oxidados e utilizados nas células.

Na análise de hidrólise de ATP pela enzima H^+ -ATPase de membrana plasmática foi observada uma diminuição proeminente nos 2 primeiros dias de armazenamento (Figura 5), que coincidem com o pico de emissão de etileno (Figura 1).

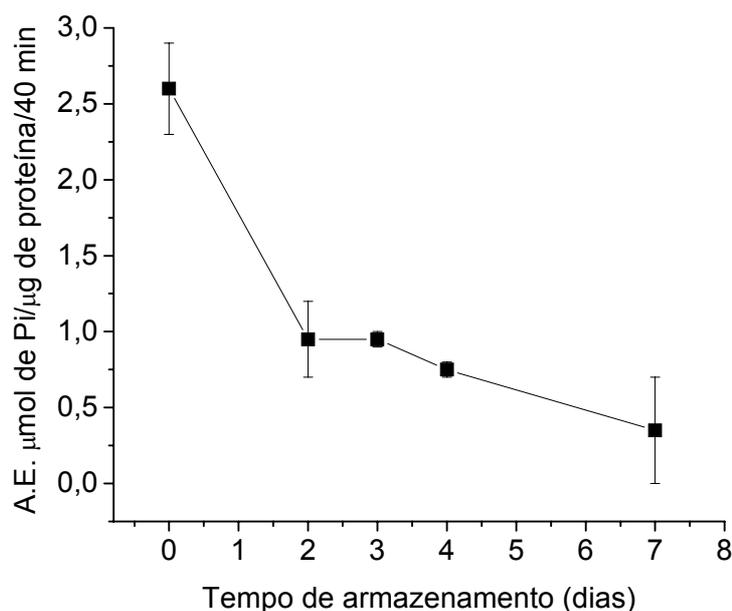


Figura 5 - Atividade ATPásica, vanadato sensível, em membrana plasmática de tecido de polpa de frutos de mamão 'Golden', em função dos dias de armazenamento dos frutos. Os dados são apresentados como uma média de 3 repetições, acompanhados da barra de erro padrão.

Os dados sugerem a ocorrência de um abrupto decréscimo na energização da plasmalema, principalmente nos primeiros estádios da maturação dos frutos,

em função da diminuição na atividade ATPásica. Desde que o gradiente eletroquímico gerado pela H^+ -ATPase de membrana plasmática seja responsável pela energização dos principais sistemas de transporte de nutrientes da célula vegetal (Morsomme e Boutry, 2000), tal diminuição na atividade desta enzima implica numa diminuição do transporte de solutos desencadeada logo após o climatério. Neste estágio, a desativação da bomba de H^+ da plasmalema, que ocorre em paralelo com o pico de emissão deste hormônio (compare Figuras 1 e 5), pode representar uma peça chave do mecanismo pelo qual o processo de transporte de açúcares e outros solutos é controlado em frutos de mamão. Até onde sabemos, não existem trabalhos relacionando às bombas de H^+ da plasmalema ao processo de maturação de frutos, mas Robinson e Davies (2000) relataram que há consideráveis mudanças nas enzimas de transporte vacuolares afetando a concentração de ácidos e açúcares durante o amadurecimento de uvas. Milner et al. (1995) observaram um aumento da atividade da H^+ -ATPase e da H^+ -PPase de vesículas de tonoplasto extraídas de pericarpo de tomate nos primeiros estádios de maturação seguida pela diminuição nas atividades de ambas as enzimas. Desde que as bombas de H^+ da plasmalema e do tonoplasto trabalhem sincronamente na regulação da homeostase do pH e no transporte e compartimentação de solutos da célula vegetal (Maeshima, 2000), pode ser que o processo de amadurecimento envolva uma diminuição progressiva da atividade destas enzimas seguido ao climatério. Futuras incursões para a investigação da atividade e expressão das bombas de H^+ das células de frutos climatéricos serão necessárias para elucidação do papel destas enzimas no processo de maturação destes frutos.

RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho fornece evidências sobre a participação da H^+ -ATPase de membrana plasmática no processo de maturação de frutos de mamão. A

sincronia da modulação desta enzima com o pico de emissão de etileno pode representar parte do mecanismo pelo qual este hormônio regula o transporte de solutos durante o climatérico no tecido mesocárpico de frutos de mamão cv. Golden.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeles, F.B.; Morgon, P.W. ; Saltveit Jr., M.E. (1992) Fruit ripening, abscission, and post-harvest disorders. *In: Abeles, F.B.; Morgon, P.W.; Saltveit Jr., M.E. (eds.) Ethylene in Plant Biology. 2nd edn. San diego, Academic Press, 182-221.*

A.O.A.C Association of Official Analytical Chemical. 1970. *Official methods of analysis*. Washington, 101p. 5.

Bleinroth, E.W. (1995) Determinação do ponto de colheita. *In: GAYET, J.P.; Bleinroth, E.P.; Matallo, M.; Garcia, E.E.C.; Garcia, A.E.; Ardito, E.F.G.; Bordin, M.R. (Ed.) Mamão para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita*. Brasília: Embrapa-SPI,10-25.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-259.

Calegario, F. F. (1997) Características físicas e químicas do fruto do mamão (*Carica papaya* L.) em desenvolvimento. Tese (Mestrado em Fisiologia Vegetal)- Viçosa – RJ, Universidade federal de Viçosa – UFV, p. 54. *In: Oliveira, M. A. B. (1999) Variações de algumas características fisiológicas de*

frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) em função de diferentes épocas de colheita. *Tese (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF*, 34 p.

Chitarra, M.I.F.; Chitarra, A.B. (2005a) *Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio*. 2º ed. Lavras: UFLA p.98.

Chitarra, M.I.F.; Chitarra, A.B. (2005b) *Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio*. 2º ed. Lavras: UFLA p. 273.

Draeta, I. Dos S.; Shimokomani, M.; Yokomizo, Y.; Fujita, J. T.; Menezes, H. C.; Bleinroth, E. W. (1975) Transformações bioquímicas do mamão (*Carica papaya* L.) durante a maturação. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, 6: 395-408. *In: Oliveira, M. A. B. (1999) Variações de algumas características fisiológicas de frutos de mamoeiro (Carica papaya L.) em função de diferentes épocas de colheita. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF*, 37 p.

Fiske, C. F.; Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66: 375.

Giannini, J.L., Briskin, D.P. (1987) Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. *Plant Physiology*, 84: 613-618.

Gamarra Rojas, G.; Medina, V.M. (1996) Mudanças bioquímicas do suco do maracujá amarelo em função da idade do fruto. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Cruz das Almas. 18 (1) 75-83.

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. (2004) 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* 173-177.

Gomes Filho, A. (2005) Ocorrência da Mancha Fisiológica do Mamoeiro (*Carica papaya* L.) sob diferentes lâminas de irrigação e coberturas de solo. *Tese (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF*, 34p.

Hiwasa, K.; Kinugasa, Y.; Amano, S.; Hashimoto, A.; Nakano, R.; Inaba, A.; Kubo, Y. (2003) Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit. *J. Exp. Bot.* 54(383):771-779.

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

Maeshima, M. (2000) Vacuolar H⁺ pyrophosphatase *Biochimica et Biophysica ACTA Membranes*, 1465: 37-51

Manica, I. (1996) Cultivares e melhoramento do mamoeiro. In: Mendes, L. G.; Dantas, J. L. L. ; Morales, C. F. G. *Mamão do Brasil*. Cruz das Almas, BA: EUFBA / EMBRAPA – CNPMFT, 7-21.

Marin, S. L. D.; Gomes, J. A.; Salgado, J. S.; Martins, D. S.; Fullin, E. A (1995) *Recomendações para a cultura do mamoeiro dos grupos Solo e Formosa no Estado do Espírito Santo. 4 ed., Vitória: EMBRAPA Circular técnica*, 57 .

Martins, D. dos S.; Costa, A de F. da (2003) *A cultura do mamoeiro*. Vitória, ES INCAPER, 410-497.

Milner, I.D.; Ho, L.C.; Hall, J.L. (1995) Properties of próton and sugar transport at the tonoplast of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. *Physiologia Plantarum* 94:399-410.

Mosca, J. L. (1992) Conservação pós-colheita dos frutos de mamoeiro *Carica papaya* L. 'Improved Sunrise Solo Line 72/12'; com utilização de filmes

protetores e cera, associados a refrigeração. Tese (Mestrado em Agronomia) – Jaboticabal – SP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP “Campus” de Jaboticabal, 91 p. *In: Oliveira, M. A. B. (1999) Variações de algumas características fisiológicas de frutos de mamoeiro (Carica papaya L.) em função de diferentes épocas de colheita. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 37 p.*

Morsomme, P.; Boutry, M. (2000) The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1465:1-16.

Paul, R.E.; Chen, N.J. (1983) Postharvest variation in cell wall-degrading enzymes of papaya (*Carica papaya* L.) during fruit ripening. *Plant Physiology*. 72(2): 382-323.

Ritzinger, C.H.P.; Souza, J.S. (2000) *Mamão: Fitossanidade*. Cruz das Almas. EMBRAPA, 91.

Robinson, S.P.; Davies, C. (2000) Molecular biology of grape berry ripening. *Aust J Grape Wine Res* 6:175-188.

Saltveit M.E. (1999) Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 15: 279-292.

Silva, H. R. F.; Martins, M. L. L.; Resende, E. D.; Vitorazi, L.; Almeida, R. F.; Pinto, L. K. A. (2004) Relação entre a atividade da enzima poligalacturonase (PG) e o amadurecimento de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). *In: Oliveira, J. G. (ed) Boletim Técnico da II Reunião de pesquisa do Frutimamão, Campos dos Goytacazes – RJ, UENF, p.331-337.*

Silva, J.R.R. (1995) Desenvolvimento do fruto do mamoeiro (*Carica papaya* L.) cv. Sunrise Solo. Tese (Mestrado em Fruticultura Tropical) Cruz das Almas – BA, Universidade Federal da Bahia – UFBA, 50. *In: Souza, G. (1998) Características físicas, químicas e sensoriais do fruto de cinco cultivares de*

mamoeiro (*Carica papaya* L.) produzidas em Macaé – RJ. *Tese (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF*, 38.

Souza, G. (1998 a) Características físicas, químicas e sensoriais do fruto de cinco cultivares de mamoeiro (*Carica papaya* L.) produzidas em Macaé – RJ. *Tese (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF*, 38p.

Souza, G. (1998 b) Características físicas, químicas e sensoriais do fruto de cinco cultivares de mamoeiro (*Carica papaya* L.) produzidas em Macaé – RJ. *Tese (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF*, 34.

Taiz, L.; Zeiger, E. (2004) *Fisiologia Vegetal* 3^a ed. – Porto Alegre: Artmed. 541p.

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. (1997) Laser-driven photoacoustic spectroscopy: What we can do with it in flooding research. *Annals of Botany*, v. 79, 57-65.

O DISTÚRBO DA GELIFICAÇÃO DA POLPA DE MAMÃO (*Carica papaya* L. cv. GOLDEN): ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS, BIOQUÍMICOS E ANATÔMICOS

RESUMO

O Brasil tem uma posição de destaque como produtor mundial de mamão. A cultivar 'Golden', emergida de uma mutação ocorrida em plantas de 'Sunrise Solo' foi selecionada por apresentar menor susceptibilidade à Mancha Fisiológica da casca. Entretanto, em certas regiões produtoras do Brasil tem sido relatada a ocorrência de um distúrbio fisiológico caracterizado por uma "gelificação" da polpa dos frutos. As bases fisiológicas e bioquímicas deste distúrbio são aqui investigadas. A observação microscópica da superfície de cortes da polpa de frutos controle e gelificados mostrou que a polpa gelificada apresenta células plasmolisadas e grandes espaços intercelulares. Frutos gelificados apresentam menor teor de sólidos solúveis totais, e teor de vitamina C na polpa, por outro lado não foram encontradas diferenças significativas na firmeza e acidez total titulável em relação aos frutos controle. Foi observada uma diminuição da atividade ATPásica das vesículas de plasmalema das células oriundas da polpa gelificada em relação à polpa controle. As bombas presentes no tonoplasto (H^+ -ATPase and

H⁺-PPase) mostraram uma tendência ao aumento da hidrólise dos substratos nas amostras de polpa gelificada. O tecido gelificado apresentou menor capacidade para manter o gradiente de prótons dependente de ATP no tonoplasto, enquanto para o gradiente formado pela H⁺-PPase foi pouco significativo mesmo em frutos controle. Os resultados sugerem que há uma diminuição na capacidade de compartimentalização de solutos e retenção de água sinalizada através de um efeito inibitório sobre a H⁺-ATPase no tecido gelificado.

ABSTRACT

Brazil has an important position as a worldwide prominence papaya producer. The 'Golden' cultivar, which has emerged from a mutation occurred in plants of 'Sunrise Solo', was selected by presenting lesser susceptibility to the skin freckles on papaya that affects the skin. However, in some producing regions from Brazil the occurrence of a physiological disturbance characterized by flesh gelling of the fruit pulp has been related. The physiological and biochemical basis of this disease were investigated in this work. The microscopical observation of surface cuts from control and flesh gelling fruit pulps showed that flesh gelling pulps present plasmolysed cells and big intracellular spaces. Flesh gelling fruits present lower total solid soluble tenor and C vitamin in the pulp, on the other hand significant differences in the firmness and titratable acid in control fruits. The reduction in the ATPase activity was observed when comparing plasmalemma vesicles from cells extracted from flesh gelling pulp in contrast with control pulp cells. Pumps from tonoplast (H⁺-ATPase and H⁺-PPase) had shown a tendency to the increase of hydrolysis of their substrates in flesh gelling samples. The flesh gelling tissue has presented lower capacity to keep the ATP-dependent proton gradient in tonoplast, while the gradient created by the H⁺-PPase was little significant ever in control fruits. The results suggest that there is a drop in the

capacity of solute compartmentalization and water retention signaled through an inhibitory effect on the H⁺-ATPase in the flesh gelling tissue.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma posição de destaque como um dos principais produtores mundiais de mamão. Entre os materiais cultivados no país destaca-se a cv. Golden originária de uma mutação natural ocorrida nas plantas 'Sunrise solo'. Dentre as vantagens dos frutos da cultivar 'Golden', que a torna preferida para exportação, estão: menor susceptibilidade à Mancha Fisiológica do Mamão (Oliveira, 2005) e amarelecimento da casca mais uniforme, resultando em um produto de melhor aparência (Marin et al., 1995; Manica, 1996). Todavia, a qualidade dos frutos dessa variedade em certas regiões produtoras do Brasil tem sido comprometida devido à ocorrência de outros distúrbios fisiológicos.

Esse distúrbio da gelificação de causa desconhecida tem ocorrência esporádica, possivelmente relacionado a fatores do ambiente como baixas temperaturas (Oliveira, 2005), podendo causar perdas significativas na produção (anexo). O distúrbio fisiológico da gelificação se caracteriza pelo aspecto gelatinoso do mesocarpo sendo observado após o corte do fruto. Em uma mesma planta-mãe são encontrados frutos normais e frutos gelificados. O desenvolvimento do distúrbio ocorre no sentido do endocarpo para o exocarpo, não havendo qualquer exteriorização desses sintomas. O fruto gelatinoso apresenta uma maior quantidade de água em seu interior na cavidade das sementes e no mesocarpo, o que o torna mais denso que os frutos controle, facilitando a sua identificação no tanque de água de lavagem dos frutos na *packing house*. Outra característica marcante desse distúrbio é o *descolamento* entre a polpa e a casca. As primeiras investigações a respeito desse distúrbio caminham no sentido de uma disfunção na capacidade de acumular íons K⁺ e água intracelular (Oliveira et al., 2002). Segundo esses autores, a polpa gelificada

apresenta também um menor conteúdo de Mg^{++} e K^+ e não foi observada diferença ($P < 0,05$) no conteúdo de Ca^{++} da polpa em relação a frutos controle. A partir dos resultados desse estudo e com base na literatura pertinente, Oliveira et al. (2002) sugeriram que esta anomalia poderia estar ligada à manutenção da integridade funcional da membrana plasmática, como exemplo, regular a entrada e manutenção de solutos responsáveis pelo turgor celular, que em hipótese para a perda na capacidade de acumular íons e água intracelular, nos frutos gelificados. Esta característica demonstra um possível desbalanço na atividade das bombas próton-motoras. As bombas de prótons são complexos protéicos associados às membranas plasmática e do vacúolo, responsáveis por gerar e manter um gradiente eletroquímico nessas membranas que potencializa a absorção de importantes íons (K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , etc.) e outros nutrientes essenciais à planta. As principais enzimas que compõem esses sistemas são: a) H^+ -ATPase do tipo P na plasmalema, b) H^+ -ATPase do tipo V e c) H^+ -pirofosfatase (H^+ -PPase), ambas no tonoplasto. Essas enzimas são capazes de acoplar a energia química da hidrólise de ATP ou de pirofosfato (PPi) à translocação de prótons do citoplasma para fora da célula ou desse para o interior do vacúolo.

Neste trabalho foi investigada a estrutura da polpa de frutos gelificados, parâmetros físico-químicos e a atividade das bombas de prótons presentes na plasmalema e no tonoplasto extraídos de polpa de mamão, cultivar Golden, controle e gelificado, visando testar a hipótese do envolvimento destes sistemas no desenvolvimento do distúrbio da gelificação.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das Amostras

Foram utilizadas amostras de mamão da cultivar 'Golden' dos pomares pertencentes à região de Linhares – ES. A região produtora apresenta

temperaturas máximas entre 30 °C e 32 °C e mínimas entre 15 °C e 18 °C (INCAPER-ES). Os frutos foram selecionados no tanque de recepção no *packing house*. Após o descarregamento dos frutos no tanque d'água foram separados daqueles que afundaram como sendo frutos gelificados, devido a sua maior densidade em relação à solução de sanitização. A partir dessa separação (os frutos que afundaram) foi feita uma classificação de acordo com o estágio de maturação selecionando-se os frutos no estágio 2 para análises seguintes. No mesmo lote de frutos onde foram selecionados os frutos gelificados foram amostrados os frutos controle (sem características do distúrbio fisiológico da gelificação), no mesmo estágio 2 de maturação.

Os frutos selecionados, controle e gelificados, foram transportados para o Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da UENF, sob refrigeração (15 °C), onde foram realizados os experimentos. Os frutos considerados gelificados foram cortados ao meio, no sentido longitudinal, sendo utilizados apenas aqueles que apresentaram os sintomas característicos de polpa gelificada, do qual foram retiradas amostras de tecido para análises físicas, físico-químicas, bioquímicas e anatômicas.

Foram utilizados 6 frutos de cada tratamento (controle e gelificado), representando as repetições, retirados aleatoriamente do lote total de frutos selecionados no laboratório.

Preparo do material para microscopia óptica

Pequenos fragmentos da polpa dos frutos controle e gelificados foram fixados, à temperatura ambiente, em uma solução aquosa contendo glutaraldeído 2,5% grau 1, paraformaldeído 4,0% e tampão cacodilato de sódio [0,05 M] em pH 7,2 por 24 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes, por 45 minutos cada, em tampão cacodilato de sódio [0,05 M]. Após duas lavagens, de 45 minutos no mesmo tampão, seguiu-se uma série de desidratação em álcool: 30%, 50%, 70%, 90% e três vezes 100%, por uma hora cada etapa. Em seguida, para o embebimento em resina, o álcool foi substituído gradualmente (álcool 3 x 1 unicryl; álcool 2 x 1 unicryl; álcool 1 x 1 unicryl; álcool 1 x 2 unicryl; álcool 1 x 3 unicryl; unicryl puro; unicryl inclusão) pela resina unicryl. As amostras em unicryl puro foram dispostas em moldes e levadas à estufa (50 °C) por 24 horas para a

polimerização e obtenção dos blocos. Com o auxílio de um ultramicrotomo (Reichert 1ultracut) e facas de vidro, foram obtidos cortes de aproximadamente 1 mm de espessura. Esses cortes foram colocados em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina 0.1%. Os cortes foram cobertos com lamínulas e selados com Entellan (Merck). O material foi observado, e documentado, no microscópio *Axioplan ZEISS* acoplado a um sistema digital (SIS) de análise de imagem.

Firmeza da polpa

Para a medição da firmeza na polpa, cada fruto foi dividido ao meio, no sentido longitudinal, resultando em duas faces. A firmeza foi determinada em três pontos equidistantes de cada face dos frutos e distanciados da casca de 0,5 cm, por meio da resistência à penetração na polpa. Para tal foi utilizado um penetrômetro de bancada (modelo 53205; Fruit Pressure Tester, Italy) com adaptador de 8,0 x 8,0 mm (altura x diâmetro). Os resultados foram expressos em Newton (N).

Determinação do teor de sólidos solúveis totais

O teor de sólidos solúveis contidos na polpa do mamão foi determinado utilizando duas gotas do suco extraído de uma amostra da polpa do fruto, de cerca de 2 g, que foi colocado sobre o prisma do refratômetro portátil (Atago N1) e os resultados expressos em °Brix.

Determinação da acidez total titulável

Para determinar a acidez total titulável da polpa dos frutos foi empregado o método N° 22.058 descrito pela A.O.A.C. (1970) com concentração de álcali de 0,1N de NaOH. Em função da polpa dos frutos de mamão possuir coloração que possa ser confundida com a cor rósea indicada pela fenolftaleína, utilizou-se o valor de pH 8,2 para determinar o ponto final da titulação. Para efetuar essa análise, cerca de 30 g de tecido da polpa foi retirado da região mediana dos frutos e homogeneizado em 50 mL de água destilada. As amostras assim preparadas foram tituladas com a solução padronizada de NaOH 0,1N. Os resultados foram

expressos em percentagem de ácido cítrico, sendo obtidos através da seguinte expressão matemática:

$$\text{ATT (\% em ácido cítrico)} = \frac{\text{volume de NaOH (mL)} \times \text{N do NaOH} \times \text{grama do ácido cítrico} \times f}{\text{Massa da amostra (g)}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que:

N = normalidade da base;

Equivalente grama do ácido cítrico = 64;

f = fator de correção da base

Análise do teor de ácido ascórbico

Para determinação do conteúdo de ácido ascórbico (AA) foi utilizado o método oficial da A.O.A.C (AOAC, 1970), que consiste na avaliação através da titulação com 2,6 - dicloroindofenol (2,6-DCP). Após retirado uma amostra de 1 g da polpa a mesma foi macerada em 10 ml de ácido oxálico 1%. Desse extrato foi retirado uma alíquota de 2 ml que foi misturado a mais 5 ml de ácido oxálico 1%, seguindo a titulação com 2,6-DCP. A titulação foi encerrada quando a solução permaneceu na cor rosa por mais de 10 segundos. A titulação foi efetuada em triplicata, descontando-se, ao final, o volume gasto na titulação do branco. O conteúdo de ácido ascórbico foi determinado ajustando-se os resultados da titulação à curva padrão preparada a partir de soluções de ácido ascórbico de concentração conhecida. Os resultados foram expressos em mg/100g de matéria fresca.

Análise enzimática

Preparação das frações microssomais

Vesículas de tonoplasto e membrana plasmática com as enzimas H⁺-ATPases e H⁺-PPases foram isoladas a partir da polpa de frutos de mamão controle e gelificado. Para tanto, foi utilizado o processo de centrifugação diferencial - descrito por Giannini & Briskin (1987), com modificações.

Após serem pesadas, as amostras de tecido da polpa foram homogeneizadas em meio tamponado, utilizando um volume de tampão proporcional (1:1) à quantidade de material fresco. A homogeneização foi feita em graal utilizando um pistilo, sendo todo o procedimento realizado em banho de gelo.

A composição e concentração final dos reagentes no tampão de extração foram as seguintes: 500 mM Sacarose, 30% (v/v) Glicerol, 210 mM tampão Tris pH 8,0, 100 mM KCl e 15 mM EDTA, 2 mM PMSF, 2 mM Benzamidina, 10 mM DTT, 0,4% BSA (p/v) e 0,3% PVPP (p/v). O material homogeneizado foi filtrado em 4 camadas de gaze e submetido à primeira centrifugação (centrífuga HITACHI himac CP) a 1.500 x *g* por 15 min, para a remoção de células não rompidas e núcleos. O sobrenadante então foi coletado e submetido a uma nova centrifugação (ultra-centrífuga HITACHI himac CP 85β) a 21.000 x *g* por 10 min para a remoção de mitocôndrias. O sobrenadante foi centrifugado a 100000 x *g* por 35 min, após o precipitado foi resuspenso em solução tampão contendo: glicerol 15%, Tris-HCl 70 mM (pH 7.6), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, PMSF 1 mM e 1 mM Benzamidina, obtendo-se dessa forma as vesículas de plasmalema e tonoplasto.

Purificação das vesículas de membrana plasmática e de tonoplasto

A fração microsomal, contendo as vesículas de membrana plasmática e tonoplasto, de polpa de mamão, foi submetida a um processo de purificação, onde foram separadas, por densidade, as vesículas de membrana plasmática daquelas de tonoplastos.

A purificação foi realizada como descrito por Serrano (1989). Neste caso, 1 mL da fração microsomal obtida foi aplicada sobre um gradiente, descontínuo, bifásico de sacarose (concentrações de 30 e 46%). Este gradiente continha, além da sacarose, 100 mM tampão Tris-HCl (pH 7,6), 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidina e 2 mM DTT. O gradiente, acrescido da fração microsomal, foi centrifugado a 100000 x *g* (ultra-centrífuga HITACHI himac CP 85 β) durante 90 minutos a 4 °C.

Após a centrifugação foram separadas as vesículas da membrana plasmática purificadas, localizadas na fase 46%, enquanto as vesículas de

tonoplasto estavam purificadas na fase de 30%. Em seguida, as referidas bandas foram coletadas e armazenadas em tubos criogênicos, com capacidade para 1 mL, os quais foram congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer (-70 °C), para análises posteriores.

Determinação da atividade hidrolítica das H⁺-ATPases e da H⁺-PPase

A atividade H⁺-ATPásica foi determinada pelo método descrito por Fiske & Subbarow (1925). A metodologia consiste na dosagem colorimétrica de fosfato inorgânico (P_i) liberado durante a hidrólise enzimática de ATP ou PP_i. A reação foi iniciada com a adição das vesículas ao meio de reação e interrompida pela adição de ácido tricloroacético (TCA) numa concentração final de 5%.

A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-120) no comprimento de onda de 750 nm. A constituição e concentração final dos reagentes no meio de reação para atividade ATPásica e PPásica foram as seguintes: 50 mM Tris-HCl pH 6,5, 3 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 1 mM ATP ou 0,1 mM de PPI e 0,06 mg.mL⁻¹ de proteína.

A hidrólise de ATP da H⁺-ATPase tipo P foi representada como atividade sensível, ao inibidor específico, ou seja: atividade total subtraída da atividade inibida por 0,2 mM de ortovanadato de sódio.

Determinação do gradiente de prótons das H⁺-ATPases e da H⁺-PPase

Para a determinação do gradiente de prótons, foi monitorado o decréscimo da fluorescência da sonda ACMA (9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina), excitada com um feixe de $\lambda = 415$ nm e a emissão captada a $\lambda = 485$ nm, em fluorímetro HITACHI F 4500. O meio de reação utilizado foi composto de 20 mM Tris-HCl (pH 6,5 para plasmalema e 7,0 para tonoplasto), 50 mM KCl, 3 mM MgSO₄, 0,25 M Sacarose, 1,3 μ M ACMA e 0,06 mg mL⁻¹ de proteína. A base do grupamento amina tem a sua capacidade de movimento transmembranar limitada. Portanto, esta sonda distribui-se através da membrana, em função da diferença de pH entre o interior e o exterior das vesículas. Para dissipar o gradiente formado foi adicionado 13mM de NH₄Cl. Essa dissipação ocorre devido à capacidade de a amônia atravessar livremente a membrana, passando para a forma NH₃⁺, a qual

se liga aos prótons localizados no interior das vesículas, transportando-os para o exterior.

A partir dos gráficos obtidos no fluorímetro foram determinados os parâmetros definidos com o auxílio de um esquadro e respeitando a escala dada pelo espectrofluorímetro em relação à fluorescência e ao tempo. Os cálculos da velocidade inicial de formação do ΔpH (V_0) e da variação da fluorescência máxima ($\Delta F_{\text{máx.}}$) foram realizados a partir das equações, respectivamente:

$$V_0 = [F_0 / (F_{\text{máx}} * T)] * 100 \quad (\text{eq. 1})$$

Onde:

F_0 = fluorescência dependente de V_0 em um tempo T qualquer, determinada pela extrapolação de uma reta tangente à maior inclinação inicial da curva para o eixo do tempo;

$F_{\text{máx}}$ = fluorescência máxima;

T = tempo de reação em minutos.

$$\Delta F_{\text{máx}} = F_{\text{eq}} / F_{\text{máx}} * 100 \quad (\text{eq. 2})$$

Onde:

F_{eq} = fluorescência de equilíbrio, determinada como fluorescência que reflete o equilíbrio entre o influxo e o efluxo de H^+ nas vesículas, sendo determinada pela equação 3:

$$F_{\text{eq}} = F_{\text{máx}} - F_{\text{F}} \quad (\text{eq. 3})$$

Onde:

$F_{\text{máx}}$ = fluorescência máxima;

F_{F} = fluorescência final.

Determinação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada em espectrofotometria a 595 nm (espectrofotômetro SHIMADZU UV – 120) - como descrito por Bradford (1976) - utilizando BSA como proteína padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise visual podemos observar que na aparência externa os frutos não se diferem, e na aparência interna os frutos gelificados continham maior quantidade de água e o aspecto gelatinoso característico do distúrbio da gelificação.



Figura 1 - Foto de frutos controle e gelificados. A: aspecto externo; B: aspecto interno.

A observação ultraestrutural do fruto gelificado sugere, o preenchimento dos espaços intercelulares com grande volume de água, resultando em um encharcamento do tecido mesocárpico (Oliveira et al., 2002). Estes dados preliminares foram aqui confirmados na observação microscópica da superfície de cortes e mostraram que no tecido da polpa há células intactas com espaço intercelulares normais no mamão controle. No tecido da polpa gelificada foram observadas células plasmolisadas e com maiores espaçamentos entre as mesmas (Figura 2). Observações feitas por Campos et al. (2003), através de microscopia eletrônica de transmissão, revelaram que tecidos dos frutos gelificados não apresentam degeneração da parede celular, contudo sugere uma menor rigidez dessa parede nos frutos que apresentam o estado gelificado, resultando em uma desestruturação da parede celular. Estudos realizados para a compreensão das alterações anatômicas em frutos indicam que as anomalias

encontradas são causadas pela diminuição do conteúdo de cálcio na estruturação da lamela média como descrito por Natale et al. (2005). Em frutos de goiaba que não receberam tratamento de cálcio foi relatado a perda de estrutura e desorganização da lamela média. Glenn e Poovaiah (1990) avaliaram por microscopia eletrônica de transmissão, as alterações da parede celular de maçãs, submetidas à aplicação de cálcio, em comparação às que não receberam a aplicação. Os autores observaram a desestruturação da lamela média em frutos que não receberam o tratamento com cálcio e indicaram extensa degradação, e os frutos que receberam cálcio foi observado que a lamela média permaneceu escura, o que indica a presença de material intercelular. Evangelista et al. (2002) avaliaram mangas pulverizadas na pré-colheita com cloreto de cálcio e observaram que os frutos controle da mangueira apresentavam desestruturação da parede celular e dissolução da lamela média. Oliveira et al. (2002) observaram que não houve diferença significativa na concentração de cálcio nos frutos controle e gelificados. Contudo, em melões no distúrbio chamado “water-soaked” foi observado em microscopia eletrônica de varredura, por análise de raio X, que há uma maior concentração de cálcio na parede celular, mas uma menor concentração nos espaços intercelulares (Chatenet et al., 2000), o que poderia causar uma descompactação da lamela média causando a desorganização celular do mesocarpo dos frutos.

A importância do cálcio na estabilidade da estrutura da lamela média é fundamental e outro aspecto de importância desse nutriente é na estabilidade da membrana. É que seu baixo conteúdo em órgãos de reserva induz à alta permeabilidade da membrana e permite a difusão de solutos desses tecidos. Essa maior permeabilidade da membrana poderia estar ocasionando a perda de solutos das células do tecido gelificado resultando no aspecto plasmolisado das células.

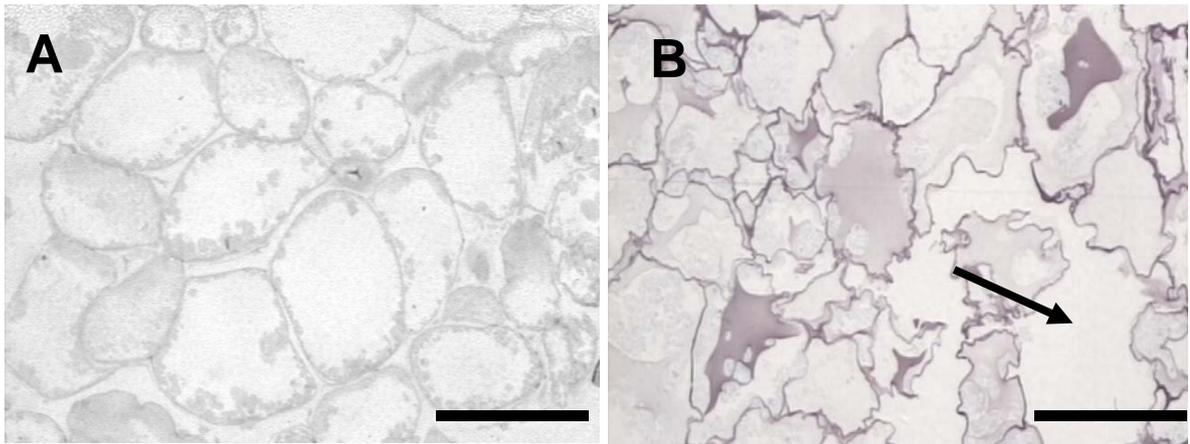


Figura 2 - Microscopia óptica de cortes de mesocarpo de frutos de mamão. A fruto sadio. B fruto gelificado mostrando células plasmolizadas com maior espaçamento intercelular (seta), barra= 100 μ m.

O estado físico dos frutos gelificados pode ser confundido com um processo de amadurecimento. O processo de amadurecimento resulta no afrouxamento do tecido mesocárpico (Chitarra e Chitarra, 2005), mas como as células se apresentam plasmolizadas esta hipótese foi descartada. A análise de firmeza realizada em frutos controle e gelificados mostraram que não há diferença significativa entre os frutos (figura 3). Os frutos apresentaram valores baixos de firmeza, indicando que os frutos controle e gelificados estavam em estágio avançado de maturação. A relação firmeza da polpa de frutos com distúrbio fisiológico semelhante a gelificação é controversa, em maçã alguns autores descrevem uma maior rigidez da polpa (Palagge et al., 1935; Gourley e Howlett 1949) e outros sugerem que ocorre um declínio da firmeza em maçãs com “watercore” (Carne, 1948).

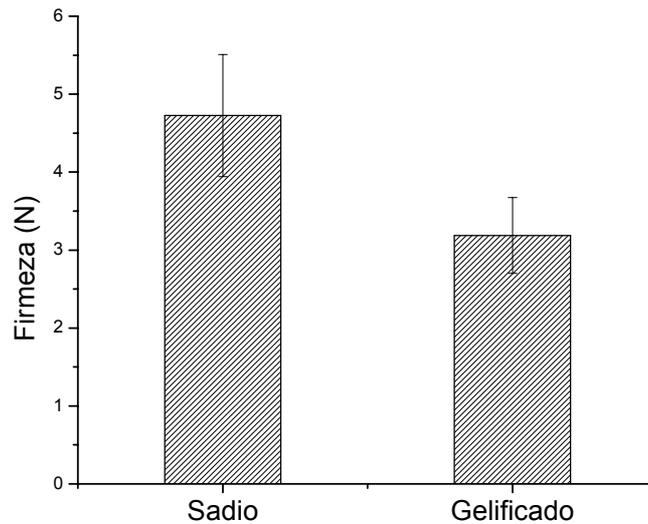


Figura 3 - Avaliação da firmeza da polpa dos frutos sadios e gelificados. Teste de análise de variância não significativo.

O resultado obtido nas análises do teor de sólidos solúveis totais da polpa dos frutos mostrou que os frutos gelificados apresentaram menores teores de SST se comparados com os frutos controle (figura 4). Nos resultados de Chen e Paull (2000), em frutos de abacaxi acometidos com distúrbio fisiológico da polpa translúcida, há um aumento no nível de solutos no apoplasto que promoveria um aumento do movimento de água para o mesmo, resultando em uma diluição da solução do apoplasto em frutos doentes. Esta diluição da solução levaria a uma diminuição do teor de SST de frutos com distúrbio fisiológico semelhante.

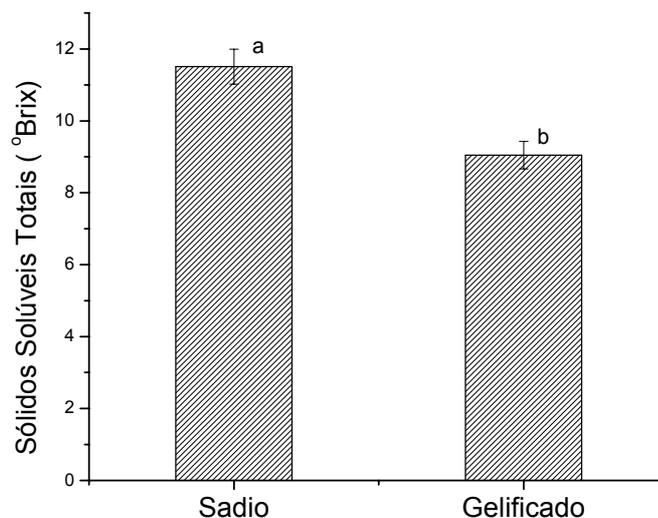


Figura 4 - Avaliação do teor de sólidos solúveis totais da polpa dos frutos sadios e gelificados. A significância entre as médias foi determinada por teste de análise de variância seguida pelo teste Tukey 0,1%.

Em relação à acidez total titulável foi observado que não houve diferença significativa entre os frutos controle e com gelificação (Figura 5). Os valores médios observados variaram de 0,044% a 0,041% de ácido cítrico. Estes valores de ATT mostraram que o teor de ácido cítrico não é influenciado pelo distúrbio da gelificação e que os frutos estavam em estádios de maturação próximos. Rodrigues et al. (2004) relataram que no fruto gelificado são produzidos ácido láctico, ácido acético e etanol, indicando que a gelificação está associada a um processo de fermentação precoce. Em maçãs também foi observado um sabor “fermentado” nos frutos com “watercore”, e o tecido desses frutos consomem menos oxigênio levando a respiração anaeróbica e conseqüentemente a fermentação (Carrick, 1929).

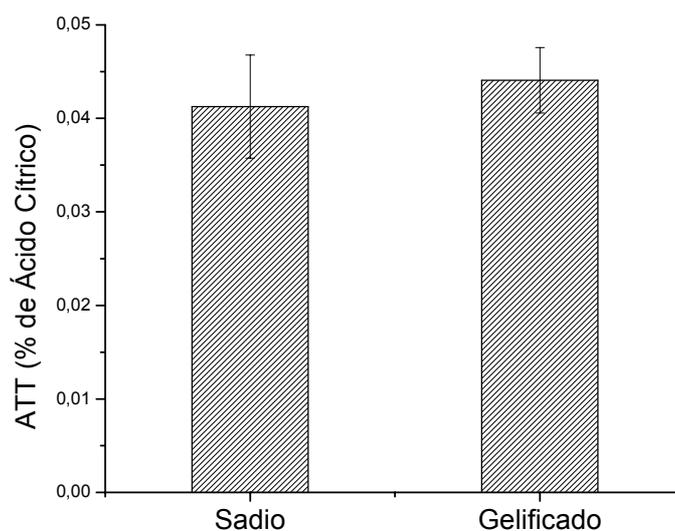


Figura 5 - Avaliação da acidez total titulável da polpa dos frutos sadios e gelificados. Teste de análise de variância não significativo.

Este processo de fermentação precoce poderia estar causando uma oxidação do ácido ascórbico nas amostras de fruto gelificado. Nas concentrações de ácido ascórbico da polpa foi observada uma diminuição proeminente da concentração desse ácido nos frutos gelificados (figura 6). A concentração de ácido ascórbico varia de acordo com as condições de crescimento, maturação e tratamento pós-colheita, portanto alterações fisiológicas podem alterar o teor de

ácido ascórbico de frutos. A oxidação anaeróbica ocorre em menor escala, esta é independente de pH, mas pode ser acelerada na faixa de pH de 3,0 e 4,0, o que não ocorreu neste experimento, pois as médias obtidas de pH nos frutos foram de 5,5 e não foi observada diferença significativa nos frutos controle e gelificados. Constantemente também pode ocorrer a oxidação aeróbica do ácido ascórbico que é dependente do pH, e em meio alcalino a oxidação é acelerada (Araújo, 1999).

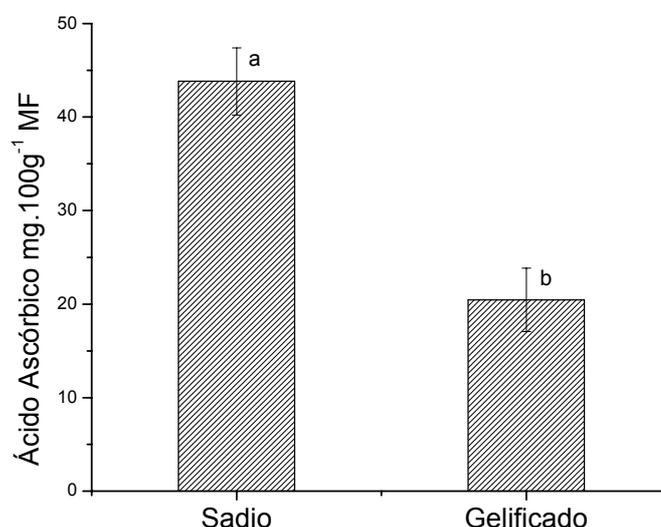


Figura 6 - Avaliação do teor de ácido ascórbico nos frutos sadios e gelificados. A significância entre as médias foi determinada por teste de análise de variância seguida do teste Tukey 0,1%.

Quando da avaliação da atividade ATPásica da plasmalema foi observado uma diminuição da atividade hidrolítica das vesículas extraídas da polpa de mamão gelificado em relação às vesículas da polpa controle (Figura 7). Isso demonstra uma diminuição na disponibilização de energia para o transporte de íons e outros solutos, por exemplo a sacarose, para o citoplasma (Morsomme e Boutry, 2000). Isto poderia explicar em parte, a menor concentração de K⁺ (Oliveira et al., 2002) e sólidos solúveis totais (Oliveira et al., 2003) observados no tecido da polpa dos frutos com o distúrbio da gelificação. Todavia, não foi

verificado um decréscimo semelhante no transporte de H^+ acoplado a esta hidrólise de ATP.

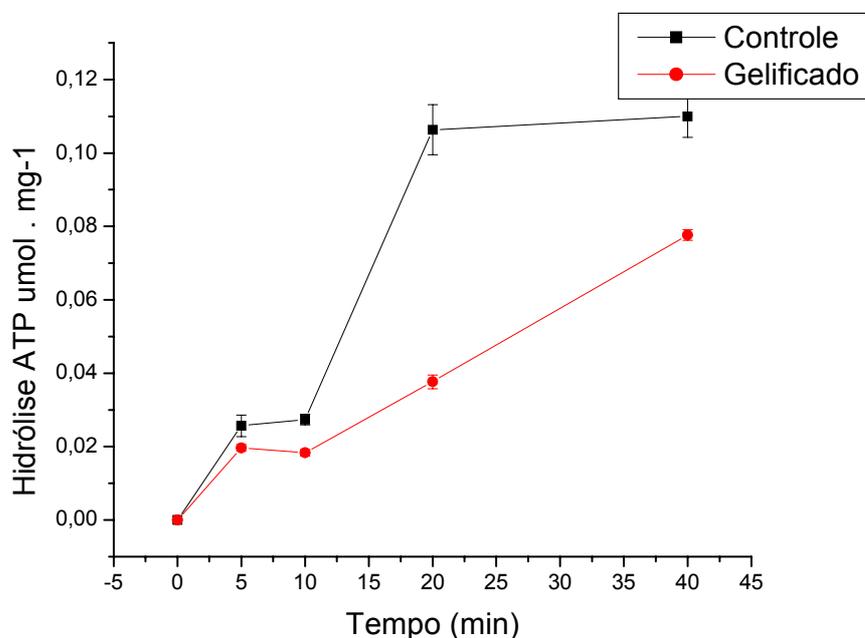


Figura 7 - Atividade ATPásica em plasmalema. O ensaio foi realizado em meio de reação contendo Tris-HCl 50 mM pH 7.0, MgSO₄ 2 mM, KCl 50 mM, ATP 1 Mm, com e sem 0,2 mM VO₄

Na análise da funcionalidade das bombas presentes nas membranas vacuolares, a atividade ATPásica e PPásicas mostrou uma tendência de aumento na hidrólise dos substratos (ATP e PPI) no extrato da polpa dos frutos com gelificação, em relação ao controle (Figuras 8 A e B). De acordo com esses dados, possivelmente no tecido gelificado poderia estar havendo uma maior atividade transportadora de íons para dentro do vacúolo, resultando na maior demanda de energia (gradiente eletroquímico de H^+), fornecida, nesse caso, pela hidrólise de ATP e PPI (Taiz e Zeiger, 1998). Entretanto, contrariando esta possibilidade os dados obtidos com a análise do gradiente de H^+ mostraram que o tecido da polpa dos frutos com gelificação apresentaram um menor gradiente de prótons, dependente de ATP, no tonoplasto (Tabelas 1 e 2). Porém, no gradiente de prótons formado pela H^+ -PPase do tonoplasto não foi observada diferença

significativa entre a atividade das enzimas (formação de gradiente de prótons) extraídas da polpa de frutos controle e aqueles gelificados (Tabela 3).

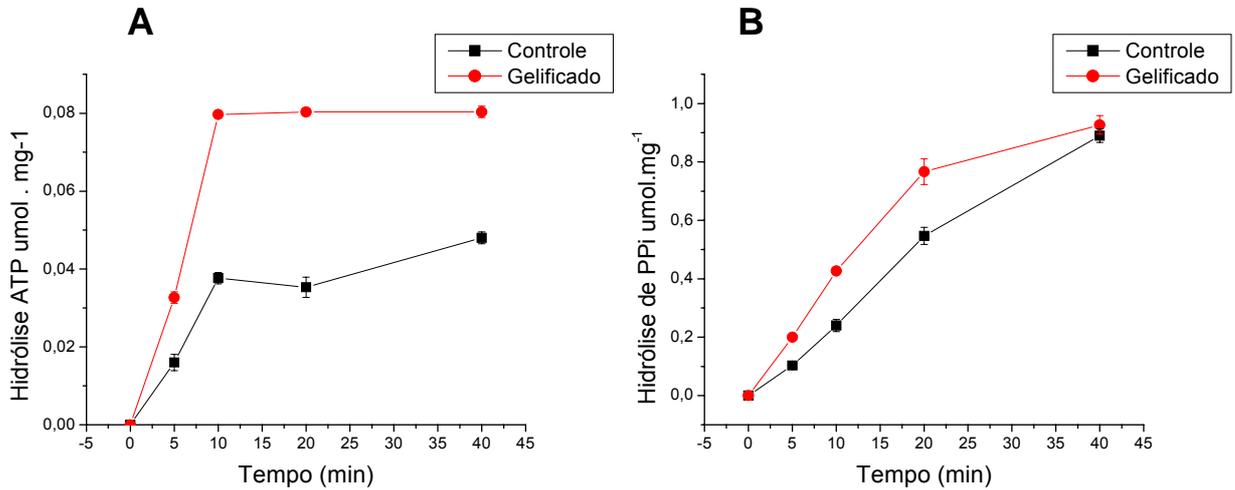


Figura 8 - (A) Atividade ATPásica em tonoplasto. (B) Atividade PPásica em tonoplasto. O ensaio foi realizado em meio de reação contendo Tris-HCl 50 mM pH 7.0, MgSO₄ 2 mM, KCl 50 mM, ATP 1 mM e PPi 1mM.

Tabela 1: Velocidade inicial e fluorescência máxima do gradiente de H⁺ dependente de ATP e PPi em vesículas da plasmalema e tonoplasto de frutos controle e gelificados. Os dados são apresentados com uma média de 3 repetições.

	Controle		Gelificado	
	Vo	F Máx	Vo	F Máx
H⁺-ATPase tipo P	21.7% ± 2,198	25,9 ± 0,144	21,2% ± 1,563	21,6% ± 1,962
H⁺-ATPase tipo V	36,1% ± 4,45	45,6% ± 5,05	18% ± 1,25	19,3% ± 3,4
*H⁺-PPase	4,7%	5,5%	6,5%	4,7%

* Dados obtidos com uma observação.

Os resultados mostraram uma tendência bastante clara de recuperação da fluorescência (do gradiente de H⁺ dependente de ATP), após cerca de 200 segundos de reação, indicando, assim, um efluxo de H⁺ no tonoplasto do tecido dos frutos gelificados (Figura 9). Essa diminuição do gradiente formado através do

tonoplasto, nos frutos gelificados podem ser relacionados ao efluxo de prótons do vacúolo, sinalizando um possível aumento na permeabilidade do tonoplasto, que levaria a um aumento da hidrólise de substratos (ATP e PPI) como forma de recuperar o gradiente de prótons deficiente. Com base nesses resultados pode-se inferir a respeito de uma possível diminuição na eficiência do tonoplasto em manter a pressão de turgor na célula, nos tecidos gelificados. Estes dados corroboram com as características anatômicas do fruto de mamão gelificado, que apresenta células plasmolizadas, além do aumento no volume de líquido no apoplasto.

Com relação à integridade da plasmalema no tecido da polpa gelificada, os dados mostram uma possível diminuição em sua capacidade de compartimentalização sinalizada através de um efeito inibitório sobre a H^+ -ATPase mostrado pelas reduções na hidrólise de ATP (Figura 7). Todavia não foi observado uma diminuição no gradiente de H^+ , o que mantém o aumento da permeabilidade da membrana vacuolar à H^+ como principal fator associado a este distúrbio.

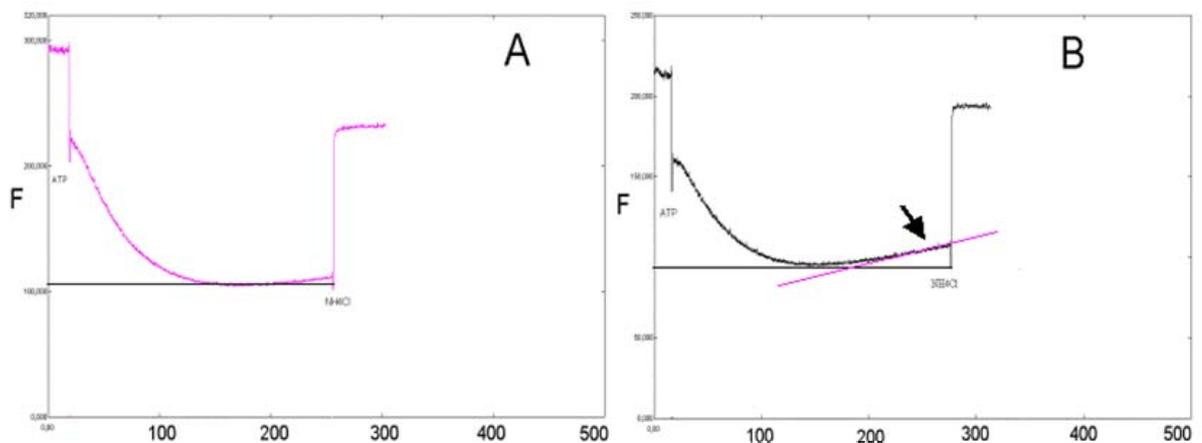


Figura 9: Gradiente de H^+ dependente de ATP em vesículas de tonoplasto de frutos controle (A) e gelificados (B). Gradiente de prótons das células dos frutos gelificados mostrando efluxo de prótons (seta). A atividade foi determinada pela variação de pH (ΔpH) através do decaimento fluorescência na presença de ACMA (9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina). O gradiente foi desfeito com NH_4Cl . F= fluorescência.

RESUMO E CONCLUSÕES

As causas do distúrbio são relacionadas à perda da pressão de turgor fornecida pelo vacúolo. A atividade das bombas H^+ mostrou que há uma deficiência energética no tonoplasto que possivelmente é um dos fatores mais importantes para a perda da pressão de turgor celular, resultando em um aspecto plasmolisado da célula do mesocarpo e a aparência de geléia dos frutos gelificados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C Association of Official Analytical Chemical. 1970. *Official methods of analysis*. Washington, 101p. 5.
- Araújo, J. M. A. (1999) *Química de alimentos: teoria e prática*. 2^oed. Viçosa: UFV 340-341.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-259.
- Campos, I. M.; Coutinho, K. S.; Cunha, M.; Oliveira, J. G.; Campostrini, E. (2003) Alterações anatômicas em frutos de mamão (*Carica papaya* L.) que apresentam o estado de Gelificação da polpa. *I Reunião de Pesquisa do Frutimamão do Norte e Noroeste Fluminense*. CD ROM.

- Carne, W.M. (1948) The non-parasitic disorders of apple fruits in Australia. *Austr. Council Sci. Indus. Res Bull*, 238.
- Carrick, D.B. (1929) The storage of apples. *Cornell Ext. Bull.* 189:28-29.
- Chatenet, C. D.; Latché, A.; Olmos, E.; Ranty, B.; Charpentreau, M.; Ranjeva, R.; Pech, J. C.; Graziana, A. (2000) Spatial-resolved analysis of histological and biochemical alterations induced by water-soaking in melon fruit. *Physiologia Plantarum* 110: 248-255.
- Chitarra, M.I.F.; Chitarra, A.B. (2005a) *Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio*. 2º ed. Lavras: UFLA p.98.
- Evangelista, R. M.; Chitarra, A. B.; Chitarra, M. I. F. (2002) Mudanças na ultra-estrutura da parede celular de mangas ‘Tommy Atkins’ tratadas com cloreto de cálcio na pré-colheita. *Revista Brasileira de fruticultura*. 24: 254-257.
- Fiske, C. F.; Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66: 375.
- Giannini, J.L., Briskin, D.P. (1987) Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. *Plant Physiology*, 84: 613-618.
- Glenn, G.M.; Poovaiah, B.W. (1990) Calcium mediated postharvest changes in texture and cell wall structure and composition in “Golden Delicious” apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115: 962-968.
- Gourley, J. H. E Howlett, F. S. (1949) Modern fruit production. *Maccnillan, New York*.
- Oliveira, J.G. (2005) A qualidade do mamão afetada por distúrbios fisiológicos. In: Martins, D.S. *Papaya Brasil: Mercado e Inovações Tecnológicas para o mamão Vitória*, ES Incaper p.147.

- Oliveira, J. G.; Campostrini, E.; Bressan-Smith, R.; Da Cunha, M.; Netto, A T.; Costa, E. S.; Coutinho, K. S.; Gomes, M. M. A; Pereira, M. G. (2002) Gelificação da polpa de frutos de mamão (*Carica papaya* L.) da variedade "Golden": caracterização de uma família . *Anais do XVII Congresso Brasileiro de fruticultura*, Belém, PA.
- Oliveira, J.G.; Bressan-Smith, R.E.; Franco, R.W.A.; Vitória, A P.; Filho, A G.; Souza, M.S.; Peçanha, V.C.; Giovannini, K.R.; Pereira, M.G. (2003) Propriedades físico-químicas de frutos de mamão (*Carica papaya* L.) da variedade Golden afetados pela gelificação da polpa. *In: Martins, D. S. Papaya Brasil qualidade do mamão para o mercado interno*. Vitória, ES Incaper 254p.
- Manica, I. (1996) Cultivares e melhoramento do mamoeiro. *In: Mendes, L. G.; Dantas, J. L. L. ; Morales, C. F. G. Mamão do Brasil*. Cruz das Almas, BA: EUFBA / EMBRAPA – CNPMFT, 7-21.
- Marin, S. L. D.; Gomes, J. A.; Salgado, J. S.; Martins, D. S.; Fullin, E. A (1995) *Recomendações para a cultura do mamoeiro dos grupos Solo e Formosa no Estado do Espírito Santo*. 4 ed., Vitória: EMBRAPA Circular técnica, 57 .
- Morsomme, P.; Boutry, M. (2000) The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1465:1-16.
- Natale, W.; Prado, R. M.; Moro, F. V. (2005) Alterações anatômicas induzidas pelo cálcio na parede celular de frutos de goiabeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* V. 40 nº 12.
- Palagge, H.H.; Maney, T.J.; Pickett, B.S. (1935) Functional diseases of the apple in storage. *Agr. Expt. Sta. Bull.* 329:33-79.
- Rodrigues, P. A. B.; Franco, R.W.A; Oliveira, J.G.; Silva, M.G.; Vargas, H.; Schripsema, J. (2004) Aplicação de ressonância magnética nuclear para o estudo do metaboloma de mamão com distúrbios fisiológicos. *In: Oliveira, J. G.*

(ed) *Boletim Técnico da II Reunião de pesquisa do Frutimamão*, Campos dos Goytacazes – RJ, UENF, p.271-276.

Serrano, R. (1989) Structure and finction of plasma membrane ATPase. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 61-94.

Taiz, L.; Zeiger, E. (1998) In.: *Plant Physiology*. 2nd ed., Sinauer Assoc., Sunderland, MA, 559.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho fornece estimativas sobre a participação das bombas do sistema primário de transporte de prótons extraída da polpa de frutos de mamão.

Os resultados sugerem uma estreita relação entre a atividade da enzima H⁺-ATPase tipo P com a emissão do etileno, sendo observado uma queda na atividade dessa após o pico de emissão do etileno. Esses dados sugerem que esteja havendo um decréscimo na demanda energética no mesocarpo, nos estádios finais da maturação do fruto, paralelamente com o decréscimo da firmeza e da acidez total titulável.

No estudo sobre o distúrbio fisiológico da gelificação os resultados mostraram uma diminuição na atividade H⁺-ATPase tipo P e no gradiente de H⁺ do tonoplasto, que resultaram na perda da capacidade das células do mesocarpo em manter a pressão de turgor. O distúrbio causa uma diminuição dos teores de sólidos solúveis totais e de vitamina C na polpa do fruto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeles, F.B.; Morgon, P.W. ; Saltveit Jr., M.E. (1992) Fruit ripening, abscission, and post-harvest disorders. *In: Abeles, F.B.; Morgon, P.W.; Saltveit Jr., M.E. (eds.) Ethylene in Plant Biology. 2nd edn. San diego, Academic Press, 182-221.*
- Agrianual (2002) Mercado e Perspectivas. São Paulo, *FNP* Consultoria & Comércio*, 374 – 387.
- Almeida, M.E.M. (2003) Processamento industrial da polpa do mamão *In: Martins, D.S. Papaya Brasil: Qualidade do mamão para o mercado interno Vitória ES – INCAPER 293.*
- A.O.A.C Association of Official Analytical Chemical. 1970. *Official methods of analysis*. Washington, 101p. 5.
- A.O.A.C Association of Official Analytical Chemists (1984) *Official methods of analysis*. Washington, 100.
- Arai. H; Terres, G.; Pink, S.; Forgac, M. (1988) Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump. *Journal Biological Chemistry*, 263: 8796-8802.

- Araújo, J. M. A. (1999) *Química de alimentos: teoria e prática*. 2ªed. Viçosa: UFV 340-341.
- Baltscheffsky, M.; Schultz, A.; Baltscheffsky, H. (1999) H⁺ proton-pumping inorganic pyrophosphatase: a tightly membrane-bound family. *FEBS Letters* 452: 121-127.
- Bleinroth, E. W.; Sigrist, J.M.M. (1989) Matéria prima. In: *Mamão Campinas ITAL* 179-254.
- Bleinroth, E.W. (1995) Determinação do ponto de colheita. In: GAYET, J.P.; Bleinroth, E.P.; Matallo, M.; Garcia, E.E.C.; Garcia, A.E.; Ardito, E.F.G.; Bordin, M.R. (Ed.) *Mamão para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita*. Brasília: Embrapa-SPI, 10-25.
- Bowman, B.J. (1983) kinetic evidence for interacting active sites in the *Neurospora crassa* plasma membrana ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 258: 13002-13007.
- Bowman, B.J.; Bowman, E.J. (1986). H⁺-ATPases from mitochondria, plasma membranes, and vacuoles of fungal cells. *Journal Membrane Biology*, 94: 83-97.
- Bowman, E.J., Siebers, A. E Altendorf, K. (1988). Bafilomycins: a class of inhibitors of membranes ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 7972-7976.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-259.
- Buchanan, B.B.; Grisse, W.; Jones, R.L. (2000) Biochemistry & Molecular Biology of Plants. *American Society of Plant Physiologists*, Rockville, Maryland 640,650.

- Calegario, F. F. (1997) Características físicas e químicas do fruto do mamão (*Carica papaya* L.) em desenvolvimento. Tese (Mestrado em Fisiologia Vegetal)- Viçosa – RJ, Universidade federal de Viçosa – UFV, p. 54. *In:* Oliveira, M. A. B. (1999) Variações de algumas características fisiológicas de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) em função de diferentes épocas de colheita. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 34 p.
- Campos, I. M.; Coutinho, K. S.; Cunha, M.; Oliveira, J. G.; Campostrini, E. (2003) Alterações anatômicas em frutos de mamão (*Carica papaya* L.) que apresentam o estado de Gelificação da polpa. *I Reunião de Pesquisa do Frutimamão do Norte e Noroeste Fluminense*. CD ROM.
- Carne, W.M. (1948) The non-parasitic disorders of apple fruits in Australia. *Austr. Council Sci. Indus. Res Bull*, 238.
- Carrick, D.B. (1929) The storage of apples. *Cornell Ext. Bull*. 189:28-29.
- Catty P.; dExaerde A.D.; Goffeau A. (1997) The complete inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases *Febs Letters* 409: 325-332.
- Chatenet, C. D.; Latché, A.; Olmos, E.; Ranty, B.; Charpentreau, M.; Ranjeva, R.; Pech, J. C.; Graziana, A. (2000) Spatial-resolved analysis of histological and biochemical alterations induced by water-soaking in melon fruit. *Physiologia Plantarum* 110: 248-255.
- Chitarra, M.I.F.; Chitarra, A.B. (2005a) *Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio*. 2º ed. Lavras: UFLA p.98.
- Chitarra, M.I.F.; Chitarra, A.B. (2005b) *Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio*. 2º ed. Lavras: UFLA p. 273.

- Crider, B.P.; Xie, X.S.; Stone, D.K. (1994) Bafilomycin inhibits proton flow through the H⁺ channel of vacuolar proton pumps. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 17379-17381.
- Cronin, S.R.; Rajini, R.; Hampton, R.Y. (2002) Cod 1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca²⁺ homeostasis. *Journal of Cell Biology*, 157: 1017-1028.
- Dantas, J. L. L.; Castro Neto, M. T. DE. (2000) Aspectos botânicos e fisiológicos. *In: Trinidad, A. V. Mamão produção: Aspectos técnicos*, Brasília: EMBRAPA – CNPMFT, 11-14.
- Dantas, J. L. L.; Morales, C.F.G.(1996) Melhoramento genético do mamoeiro. *In: Mendes, L. G., Dantas, J.L.L., Morales, C. F. G. Mamão do Brasil*. Cruz das Almas, BA: EUFBA/EMBRAPA-CNPMFT 121-143.
- Dietz K.J.; Tavakoli N.; Kluge C.; Mimura T.; Sharma S.S.; Harris G.C.; Chardonnens A.N.; Golldack D. (2001) Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level *Journal of Experimental Botany* 363: 1969-1980.
- Draeta, I. Dos S.; Shimokomani, M.; Yokomizo, Y.; Fujita, J. T.; Menezes, H. C.; Bleinroth, E. W. (1975) Transformações bioquímicas do mamão (*Carica papaya* L.) durante a maturação. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, 6: 395-408. *In: Oliveira, M. A. B. (1999) Variações de algumas características fisiológicas de frutos de mamoeiro (Carica papaya L.) em função de diferentes épocas de colheita. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 37 p.*

- Evangelista, R. M.; Chitarra, A. B.; Chitarra, M. I. F. (2002) Mudanças na ultra-estrutura da parede celular de mangas 'Tommy Atkins' tratadas com cloreto de cálcio na pré-colheita. *Revista Brasileira de fruticultura*. 24: 254-257.
- Façanha, A.R.; De Meis, L. (1998) Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiology*, 116: 1487-1495.
- Façanha, A. R.; de Meis; L. (1995) Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. *Plant Physiology* 108: 241.
- Filho, A. G. (2005) ocorrência da Mancha Fisiológica do mamão (*Carica papaya* L.) sob diferentes lâminas de irrigação e coberturas de solo. *Tese (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF*, 32 p.
- Fiske, C. F.; Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66: 375.
- Forgac, M. (1998) Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺) ATPase. *FEBS Letters*, 440: 258-263.
- Forgac, M. (1999) Structure and properties of the vacuolar (H⁺) ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 274: 12951-12954.
- Gamarra Rojas, G.; Medina, V.M. (1996) Mudanças bioquímicas do suco do maracujá amarelo em função da idade do fruto. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Cruz das Almas. 18 (1) 75-83.
- Giannini, J.L., Briskin, D.P. (1987) Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. *Plant Physiology*, 84: 613-618.

- 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. (2004) 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* 173-177.
- Glenn, G.M.; Poovaiah, B.W. (1990) Calcium mediated postharvest changes in texture and cell wall structure and composition in "Golden Delicious" apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115: 962-968.
- Gomes Filho, A. (2005) Ocorrência da Mancha Fisiológica do Mamoeiro (*Carica papaya* L.) sob diferentes lâminas de irrigação e coberturas de solo. *Tese (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF*, 34p.
- Gourley, J. H. E Howlett, F. S. (1949) Modern fruit production. *Macmillan, New York*.
- Harold, F.M. (1986) The vital force. A study of bioenergetics. *New York. Freeman*.
- Hiscox, J.D.; Israelstan, G.F. (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57: 1332-1334.
- Hiwasa, K.; Kinugasa, Y.; Amano, S.; Hashimoto, A.; Nakano, R.; Inaba, A.; Kubo, Y. (2003) Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit. *J. Exp. Bot.* 54(383):771-779.
- Jiang, S.S.; Fan, L.L.; Yang, S.J.; Kuo, S.Y.; Pan, R.L. (1997) Purification and characterization of thylakoid membrane-bound inorganic pyrophosphatase from *Spinacia oleracea* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 346: 105-112.

- Kakinuma, Y., Ohsumi, Y. e Anraku, Y. (1981). Properties of H⁺ translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 256: 10859-10863.
- Kays, S.T. In: *Postharvest physiology of perishable plant products*. New York: A VI, 1994. 532p.
- Laarrhoven, L. J. J., (1998) Infrared LASER based Photoacoustic trace gas detection, *Universiteit Nijmegen*, Holanda.
- Lida, H., Yagawa, Y. e Anraku Y. (1990). Essential role for induced Ca²⁺ influx followed by [Ca²⁺] in maintaining viability of yeast cells late in the mating pheromone response pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 265: 13391-13399.
- Logan, H.; Basset, M.; Very, A. A.; Setenac, H. (1997) Plasma membrane transport systems in higher plants: From black boxes to molecular physiology. *Plant Physiology* 100: 1.
- Maeshima, M. (1990) Oligomeric structure of H⁺ translocating inorganic pyrophosphatase of plant vacuoles. *Biochem. Biophys. Res Commun* 168: 1157.
- Maeshima, M. (2000) Vacuolar H⁺ pyrophosphatase *Biochimica et Biophysica ACTA Membranes*, 1465: 37-51
- Maeshima, M.; Yoshida, S. (1989) Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 20068.
- Manica, I. (1996) Cultivares e melhoramento do mamoeiro. In: Mendes, L. G.; Dantas, J. L. L. ; Morales, C. F. G. *Mamão do Brasil*. Cruz das Almas, BA: EUFBA / EMBRAPA – CNPMFT, 7-21.

- Marin, S.L.D.; Gomes, J.A. (2000) Técnicas de cultivo de mamão. *In: Sales R. de O. Semana Internacional de Fruticultura e Agrodústria, Fortaleza: SINDIFRUTA – FRUTAL, 57.*
- Marin, S. L. D.; Gomes, J. A.; Salgado, J. S.; Martins, D. S.; Fullin, E. A (1995) *Recomendações para a cultura do mamoeiro dos grupos Solo e Formosa no Estado do Espírito Santo. 4 ed., Vitória: EMBRAPA Circular técnica, 57 .*
- Martins, D. dos S.; Costa, A de F. da (2003) *A cultura do mamoeiro.* Vitória, ES INCAPER, 410-497.
- Milner, I.D.; Ho, L.C.; Hall, J.L. (1995) Properties of próton and sugar transport at the tonoplast of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. *Physiologia Plantarum* 94:399-410.
- Morsomme, P.; Boutry, M. (2000) The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465:1-16.
- Mosca, J. L. (1992) Conservação pós-colheita dos frutos de mamoeiro *Carica papaya* L. 'Improved Sunrise Solo Line 72/12'; com utilização de filmes protetores e cera, associados a refrigeração. Tese (Mestrado em Agronomia) – Jaboticabal – SP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP “ Campus” de Jaboticabal, 91 p. *In: Oliveira, M. A. B. (1999) Variações de algumas características fisiológicas de frutos de mamoeiro (Carica papaya L.) em função de diferentes épocas de colheita. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 37 p.*
- Morsomme, P.; Boutry, M. (2000) The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1465:1-16.

- Natale, W.; Prado, R. M.; Moro, F. V. (2005) Alterações anatômicas induzidas pelo cálcio na parede celular de frutos de goiabeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* V. 40 nº 12.
- Nelson, N.; Taiz, L.; (1989) The evolution of H⁺-ATPase. *Trends Biochemistry Science*, 14: 113.
- Nelson, N.; Harvey, W.R. (1999) Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiology Reviews* 79: 361-385.
- Oliveira, J.G. (2005) A qualidade do mamão afetada por distúrbios fisiológicos. *In: Martins, D.S. Papaya Brasil: Mercado e Inovações Tecnológicas para o mamão* Vitória, ES Incaper p.147.
- Oliveira, J.G.; Bressan-Smith, R.E.; Franco, R.W.A.; Vitória, A P.; Filho, A G.; Souza, M.S.; Peçanha, V.C.; Giovannini, K.R.; Pereira, M.G. (2003) Propriedades físico-químicas de frutos de mamão (*Carica papaya* L.) da variedade Golden afetados pela gelificação da polpa. *In: Martins, D. S. Papaya Brasil qualidade do mamão para o mercado interno*. Vitória, ES Incaper 254p.
- Oliveira, J. G.; Campostrini, E.; Bressan-Smith, R.; Da Cunha, M.; Netto, A T.; Costa, E. S.; Coutinho, K. S.; Gomes, M. M. A; Pereira, M. G. (2002) Gelificação da polpa de frutos de mamão (*Carica papaya* L.) da variedade "Golden": caracterização de uma família . *Anais do XVII Congresso Brasileiro de fruticultura*, Belém, PA.
- Okorokova-Façanha, A.L.; Appelgran, H.; Tabish, M.; Okorokov, L.; Ekwall, K. (2002) The endoplasmatic reticulum cation P-type ATPase Cta4p is required for control of cell shape and microtubule dynamics. *Journal of Cell Biology* 157: 1029-1039.

- Paul, R.E.; Chen, N.J. (1983) Postharvest variation in cell wall-degrading enzymes of papaya (*Carica papaya* L.) during fruit ripening. *Plant Physiology*. 72(2): 382-323.
- Pedersen, P.L.; Carafoli, E. (1987). Íon motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *TIBS* 12: 146-150.
- Perzov, N.; Padler-Karavani, V.; Nelson, N.(2001) Features of V-ATPases that distinguish them from F-ATPases. *FEBS Letters* 504: 223-228.
- Palagge, H.H.; Maney, T.J.; Pickett, B.S. (1935) Functional diseases of the apple in storage. *Agr. Expt. Sta. Bull.* 329:33-79.
- Pocasagrande Enamorado, H.E.; Finger, F.L.; Barros, F.L.; Puschmann, R. (1995) Development and ripening of yellow passion fruit. *Journal of Horticultural Science* 70 (4): 573-576.
- Ratajczak, R. (2000) Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465 : 17-36.
- Rea, P.A.; Kim, Y.; Sarafin, V.; Poole, R. J.; Davies, J. M.; Sanders, D. (1992) Vacuolar H⁺ translocating pyrophosphatases: A new category of íon translocase. *Trends Biochemistry Science*. 14: 348.
- Rhodes, M. J. C. (1970) The climateric and ripening of fruits. In: Hulme, A. C. The Biochemistry of fruits and their products. London: Academic press, V. 1, p.521-533. In: Chitarra, M. I. ; Chitarra, A. B. (2005) *Pós-Colheita de frutas e Hortaliças: Fisiologia e Manuseio*. 2º ed. Lavras – UFLA p. 77.
- Ritzinger, C.H.P.; Souza, J.S. (2000) *Mamão: Fitossanidade*. Cruz das Almas. EMBRAPA, 91.
- Robinson, S.P.; Davies, C. (2000) Molecular biology of grape berry ripening. *Aust J Grape Wine Res* 6:175-188.

- Rodrigues, P. A. B.; Franco, R.W.A; Oliveira, J.G.; Silva, M.G.; Vargas, H.; Schripsema, J. (2004) Aplicação de ressonância magnética nuclear para o estudo do metaboloma de mamão com distúrbios fisiológicos. *In: Oliveira, J. G. (ed) Boletim Técnico da II Reunião de pesquisa do Frutimamão, Campos dos Goytacazes – RJ, UENF, p.271-276.*
- Saltveit M.E. (1999) Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Tecnology*, 15: 279-292.
- Salunkhe, D.K.; Desai, B.B. (1984) Papaya in: Postharvest biotechnology of fruits, Boca Raton: Flórida, *CRC Press*, 2: 13-26.
- Sanders, D.; Bethke, P. (2000) Membrane transport. In: Biochemistry & molecular biology of plants. *American Society of Plant Physiologists. ASPP. Rockville* p. 110-158.
- Sato, M. H.; Maeshima, M.; Ohsumi, Y.; Yoshida, M. (1991) Dimeric struture of H⁺ translocating pyrophosphatase from pumpin vacuolar membranes. *FEBS Letters*, 290: 177.
- Scott, D.A.; De Souza, W.; Benchimol, M.; Zhong, L.; Lu, H.G.; Moreno, S.N.J.; Docampo, R. (1998) Presence of a plant-like proton pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of Trypanossoma cruzi. *Journal of Biological Chemistry* 273: 22151-22158.
- Serrano, R. (1989) Structure and finction of plasma membrane ATPase. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 61-94.
- Silva, H. R. F.; Martins, M. L. L.; Resende, E. D.; Vitorazi, L.; Almeida, R. F.; Pinto, L. K. A. (2004) Relação entre a atividade da enzima poligalacturonase (PG) e o amadurecimento de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). *In: Oliveira, J. G. (ed) Boletim Técnico da II Reunião de pesquisa do Frutimamão, Campos dos Goytacazes – RJ, UENF, p.331-337.*

- Silva, J.R.R. (1995) Desenvolvimento do fruto do mamoeiro (*Carica papaya* L.) cv. Sunrise Solo. Tese (Mestrado em Fruticultura Tropical) Cruz das Almas – BA, Universidade Federal da Bahia – UFBA, 50. In: Souza, G. (1998) Características físicas, químicas e sensoriais do fruto de cinco cultivares de mamoeiro (*Carica papaya* L.) produzidas em Macaé – RJ. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 38.
- Silva, M.G.; Oliveira, J.G.; Vitória, A.P.; Corrêa, S.F.; Pereira, M.G.; Campostrini, E.; Santos, E.O.; Cavalli, A.; Vargas, H. (2005) Correlation between ethylene emission and skin colour changes during papaya (*Carica papaya* L.) fruit ripening. *J. Phys. IV*. 125:877-879.
- Souza, G. (1998 a) Características físicas, químicas e sensoriais do fruto de cinco cultivares de mamoeiro (*Carica papaya* L.) produzidas em Macaé – RJ. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 38p.
- Souza, G. (1998 b) Características físicas, químicas e sensoriais do fruto de cinco cultivares de mamoeiro (*Carica papaya* L.) produzidas em Macaé – RJ. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 34.
- Sze, H.; Xuhang, L.; Palmgran, M.G. (1999) Energization of plant cell membranes by H⁺ pumping ATPases: regulation and biosynteses. *The Plant Cell* 11: 677-689.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (1998) In.: *Plant Physiology*. 2nd ed., Sinauer Assoc., Sunderland, MA, 559.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2004) *Fisiologia Vegetal* 3^a ed. – Porto Alegre: Artmed. 541p.

- Takasu, A.; Nakanishi, Y.; Yamauchi, T.; Maeshima, M. (1997) Analysis of the substrate binding site and carboxyl terminal region of vacuolar H⁺-pyrophosphatase of mung bean with peptide antibodies. *Journal of Biochemistry* 122: 883.
- Terrier, N.; François-Xavier, S.; Ageorges, A.; Romieu, C. (2001) Changes in acidity and in proton transport at the tonoplast of grape berries during development. *Planta* 213: 20-28.
- Tomashek, J. J.; Grahan, L.A.; Hutchins, U. M.; Stevens, T. H.; Klionsky, D. J. (1997) V₁-studded stalk subunits of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 26787.
- Wellbern, A.R. (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144: 307-313.
- 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. (1997) Laser-driven photoacoustic spectroscopy: What we can do with it in flooding research. *Annals of Botany*, v. 79, 57-65.
- Zhen, R.G.; Baykov, A.A.; Bakuleva, N.P.; Rea, P.A. (1994) Amino methylated diphosphonate: A potent type-specific inhibitor of both plant and phototrophic bacterial H⁺-pyrophosphatase. *Plant Physiology*, 104: 153.

APÉNDICE

Quadro 1: Histórico mensal climático da região de Linhares – ES, latitude 19° 24' S, longitude 40° 04' O e altitude de 28m no ano de 2004.

Estação : LINHARES Estado : Espírito Santo Período: 2004
 LAT : 19°24' LONG : 40°04' W.Grw. _____ ALT : 28 m

Meses	Pressão Atmosférica (mb)	TEMPERATURA DO AR (C°)						Média compensada	Umidade relativa (%)	Nebulosidade o-10	PRECIPITAÇÃO			Evaporação total (mm)	Insolação total (horas e décimos)	Dias de chuva
		Média das máximas	Média das mínimas	Máxima Absoluta		Mínima Absoluta					Máxima em 24 h					
				Graus	Data	Graus	Data					Altura total (mm)	Altura (mm)			
JAN		29,7	22,5	33,4	01	19,2	20	25,4	85	8	282,3	63,3	31	95,8	112,2	22
FEV	1.010,4	30,8	22,4	35,6	29	19,6	09	25,8	83	6	126,2	22,4	27	85,0	153,2	19
MAR	1.010,9	30,0	21,8	33,0	11	18,6	25	25,2	84	7	298,3	117,8	03	82,6	151,6	22
ABR	1.012,4	29,3	21,3	32,4	25	17,2	29	24,6	86	6	305,8	90,6	11	63,0	164,4	19
MAI	1.014,1	28,4	20,0	31,8	14	17,2	31	23,3	83	6	52,7	33,3	21	81,0	158,4	9
JUN	1.017,8	27,1	17,6	30,0	02	15,0	06	21,5	85	5	90,1	35,0	05	65,8	171,9	10
JUL	1.017,2	25,9	17,5	29,6	09	11,8	25	20,8	85	6	99,0	26,6	02	79,5	161,6	14
AGO	1.017,5	27,3	17,8	30,6	28	14,2	12	21,4	81	4	17,9	7,1	15	102,8	242,9	8
SET	1.016,7	28,8	17,9	31,6	29	13,4	07	22,7	75	4	9,9	8,2	21	127,2	180,0	6
OUT	1.014,0	29,3	20,2	33,4	19	15,6	08	23,8	78	6	106,1	71,3	27	132,5	116,0	16
NOV	1.012,5	29,2	21,4	33,6	12	18,8	22	24,8	79	7	115,7	64,6	30	120,0	137,2	11
DEZ	1.011,0	30,7	22,7	34,8	09	19,8	02	25,8	83	7	239,5	93,0	13	99,4	173,6	14
ANO	1.013,6	28,9	20,3	35,6	29/02	11,8	25/07	23,8	82	6	1743,5	117,8	03/03	1134,6	1923,0	170