**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Amolecimento precoce da polpa e sua relação com as modificações da parede celular em mamões ‘Golden’

Camilla Zanotti Gallon

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba
2010**

Camilla Zanotti Gallon
Bióloga

**Amolecimento precoce da polpa e sua relação com as modificações da
parede celular em mamões ‘Golden’**

Orientador:
Prof. Dr. ANGELO PEDRO JACOMINO

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Gallon, Camilla Zanotti

Amolecimento precoce da polpa e sua relação com as modificações da parede celular
em mamões 'Golden' / Camilla Zanotti Gallon. - - Piracicaba, 2010.
111 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Distúrbios fisiológicos de plantas 2. Enzimas 3. Mamão 4. Maturação vegetal
Parede celular vegetal 6. Polpa I. Título

CDD 634.651
G173a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

“ Só quem se arrisca a ir longe demais descobre o quão longe se pode ir”

(Thomas Eliot, 1888-1965)

Dedico
ao querido Felipe.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Angelo Pedro Jacomino por confiar a mim este trabalho tão desafiante que aguçou minha curiosidade na pesquisa. Foi muito estimulante estar ao seu lado durante os quatro anos que se passaram. Neste aspecto, o tempo passou mais depressa do que eu gostaria. Foi para mim um exemplo de profissional e carisma, quem eu terei como referência.

Ao Eduardo Purgatto que aceitou ser meu co-orientador, e me contagiou pelo seu interesse em fisiologia. Espero compartilhar com você as inúmeras perguntas e várias respostas que virão nas próximas pesquisas. Agradeço ainda a turma do Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, por me acolherem durante o período em que estive por lá em meio às análises, em especial a Tânia Shiga que cuidadosamente me acompanhou com as análises de parede celular.

Ao Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de pesquisa durante meu doutorado.

A Empresa Caliman Agrícola S/A pelo fornecimento dos frutos e a prontidão em apoiar minha pesquisa e aos seus funcionários, Luciane, Roseli e Elieuder, por poder contar com eles durante a colheita, tratamento e embalagem dos inúmeros frutos.

A Universidade Federal do Espírito Santo por proporcionar a realização da minha Graduação e do meu Mestrado, cujos cursos foram fundamentais para a minha formação. A prof^ª. Diolina, por gentilmente disponibilizar seu Laboratório na UFES no início do doutorado.

Aos membros da banca: José Fernando Durigan, Ricardo Alfredo Kluge, Lazaro Eustaquio Peres e João Paulo Fabi, pela disponibilidade e contribuições.

A ESALQ, escola maravilhosa. Abracei como minha.

Ao Programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas onde conheci pessoas que jamais esquecerei. Agradeço ao Ricardo Kluge, que deixou seu laboratório de portas abertas para a realização das análises bioquímicas. Agradeço a companhia da secretária Solizete, pronta para todas as informações e ainda uma verdadeira confidente. Ela, junto com a Luciane do PPG em

Fitotecnia me proporcionaram muitas risadas durante os intervalos para o café. Agradeço os conselhos dos amigos que conheci no doutorado: Tatiana, Rogério e Livia, com certeza a amizade de vocês tornou meu caminho mais divertido. Sentirei saudade. Agradeço Monita e Roberto, por todos os momentos agradáveis que passamos juntos. Tenho certeza que esta amizade não acabará com a distância.

Aos amigos do laboratório de Pós-Colheita de Produtos Hortícolas: Marcos e seu auxílio pelo sentimental cromatógrafo; Elaine e Flávia, que já defenderam suas teses, mas sempre me lembrarei da prontidão em ajudar; aos estagiários que vêm e vão e àqueles que permaneceram - foram muito prestativos; Vanessa, Ana Elisa, Patrícia, Jaqueline, Meire e Carol, qualquer motivo era suficiente para fazermos uma comemoração, às vezes um doce, um lanche, e quando não dava tempo, o barzinho da esquina resolvia.

As amigas de Vitória, Danielli, Grasielle e Renata. Muitas viagens para coletar frutos serviram como uma visita. À Tati e Laís, amigas da Mi que “adotei” como minhas. Obrigada pelos momentos de descontração em SP.

Ao Felipe, por estar ao meu lado nas tantas incertezas que surgiram pelo caminho, por me acompanhar nesta jornada e me dar uns “empurrõezinhos” nos momentos de decisão e, acima de tudo, por contribuir para minha felicidade. Foram tantas as mudanças nos últimos quatro anos, não? Obrigada por toda compreensão e amor.

A D. Iracema, que brindou comigo vários cafezinhos desde meu mestrado! Agradeço suas preciosas correções de gramática, e pelos conselhos nos momentos de ansiedade.

Ao Arthur e Inês por propiciarem deliciosos almoços de domingo em SP, com direito as correções do resumo e “abstract” desta tese.

Aos meus pais, Durval e Suely por me apoiarem nas minhas escolhas. À Micheli, minha irmã que sempre será meu exemplo de força para seguir em frente. Minha irmã Sabrina, que me distraía nos momentos de estresse, mesmo à distância. Tenho comigo uma cartinha de quando ela ainda começou a escrever e eu sequer sabia o que era a Biologia. Nesta carta ela já dizia que eu seria uma grande “cuidadora de plantas”. Desejo que minhas pesquisas não parem por aqui.

SUMÁRIO

RESUMO	9
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivo específico	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Cultura do mamoeiro	17
3.2 Estresse	18
3.3 Distúrbios fisiológicos no mamoeiro	19
3.4 Parede celular e perda de firmeza da polpa	21
3.5 Enzimas de parede celular	24
3.6 Regulação hormonal da perda de firmeza	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Coleta dos frutos	31
4.2 Delineamento experimental	32
4.3 Metodologia do Índice de Amolecimento (IA)	33
4.4 Análises físicoquímicas	34
4.4.1 Coloração da casca	34
4.4.2 Firmeza da polpa	34
4.4.3 Sólidos solúveis	35
4.4.4 Ácido ascórbico	35
4.4.5 Acidez titulável	35
4.5 Análises fisiológicas	35
4.5.1 Atividade respiratória e produção de etileno	35
4.6 Análises bioquímicas	36
4.6.1 Extração das enzimas β -galactosidase e β -glicosidase	36

4.6.1.1 Atividade da β -galactosidase	36
4.6.1.2 Atividade da β -glicosidase	37
4.6.2 Extração e atividade da enzima pectinametilesterase	37
4.6.3 Dosagem de proteínas	38
4.6.4 Fracionamento da parede celular	38
4.7 Análise hormonal	39
4.7.1 Extração e quantificação do ácido 3-indol acético (AIA)	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Caracterização físicoquímica	41
5.1.1 Coloração da casca e firmeza da polpa	41
5.1.2 Sólidos solúveis, acidez titulável e ácido ascórbico	46
5.2 Caracterização fisiológica	51
5.2.1 Atividade respiratória e produção de etileno	51
5.3 Caracterização bioquímica	57
5.3.1 Perfil da atividade de enzimas da parede celular	57
5.3.2 Fracionamento da parede celular	61
5.4 Caracterização hormonal	68
5.4.1 Níveis de auxina em mamões com e sem DAP.....	68
5.4.2 Níveis de auxina durante o desenvolvimento de mamões ‘Golden’	71
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
6.1 Direcionamento para futuras análises	77
REFERÊNCIAS	79
ANEXOS.....	93

RESUMO

Amolecimento precoce da polpa e sua relação com as modificações da parede celular em mamões ‘Golden’

A ocorrência de mamões ‘Golden’ com casca verde e polpa mole, em determinadas épocas do ano, tem sido relatada por produtores da região Norte do Espírito Santo. Não sendo possível distinguir frutos com o distúrbio do amolecimento precoce (DAP) apenas pela análise da cor da casca e da firmeza da polpa no momento da colheita, o objetivo deste trabalho foi estudar aspectos da fisiologia e bioquímica do amadurecimento que pudessem auxiliar no entendimento da perda precoce da firmeza. As coletas ocorreram no período de maior frequência de frutos com o distúrbio (meados de verão a final de outono). Os frutos foram coletados no estágio 1 de maturação, armazenados a $10^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $85\pm 10\%$ UR, durante 10 dias e submetidos à metodologia do Índice de Amolecimento (IA). O sintoma do amolecimento precoce foi observado claramente no 4º dia após o armazenamento sendo verificada a perda de firmeza nos frutos com DAP entre o 2º e o 8º dia a 10°C , sendo o decréscimo na firmeza equivalente a 71% da firmeza inicial, comportamento atípico para frutos armazenados sob refrigeração. Frutos com e sem DAP não apresentaram diferença significativa no teor de sólidos solúveis, acidez titulável e ácido ascórbico. A atividade respiratória e a produção de etileno foram reduzidas com o armazenamento refrigerado, sem diferença entre os frutos com e sem DAP, o que sugere que o aparecimento do distúrbio não se deve ao aumento na produção de etileno no período pós-colheita. Os resultados indicam forte associação entre o amolecimento precoce e mudanças na parede celular. O rendimento das frações solúvel em água (FSA) e em NaOH (FSH) nos frutos com DAP, foi superior ao observado nos frutos sem DAP, durante todo o período de armazenamento. O menor nível da fração solúvel em imidazol (FSI) no tempo 0 pode estar associado à maior atividade da pectinametilesterase nos frutos com DAP. O decréscimo na fração celulose (CEL) em frutos com DAP pode indicar modificação na parede celular, ao nível celulose-hemicelulose. A produção de etileno não acompanhou as modificações na parede celular, sugerindo que alterações na estrutura da parede podem ter ocorrido durante o crescimento do fruto. Frutos com DAP apresentaram níveis de auxina (AIA) 6 vezes menor do que frutos sem DAP, no dia 0, sem diferença durante o armazenamento. Possivelmente os níveis de AIA nos frutos com DAP estavam reduzidos quando o fruto ainda estava ligado à planta. O distúrbio possivelmente está relacionado à alteração na parede celular e níveis de AIA. Desta forma, uma alteração hormonal durante o desenvolvimento do fruto – anterior à colheita –, associada à sensibilidade do fruto à essa sinalização hormonal, levaria à mudanças na parede celular, o que determinaria a ocorrência do distúrbio do amolecimento precoce.

Palavras-chave: Perda de firmeza da polpa; Distúrbio fisiológico; Enzimas de parede celular; Fracionamento da parede celular; *Carica papaya* L.

ABSTRACT

Flesh Early Softening in ‘Golden’ papaya fruit and its relation to cell wall modifications

The occurrence of green skin and soft pulp in ‘Golden’ papaya fruit during certain seasons has been reported by orchards in northern Espírito Santo State, Brazil. It is not possible solely by skin color and pulp firmness analysis to distinguish early softening disorder fruits (DAP), at the time of harvest, from those without the disorder. The aim of this work was to study the physiological and biochemical ripening aspects that might help to understand the early softening disorder. Fruits were harvested on the most common seasons (mid-summer to mid-autumn) in maturity stage 1 and evaluated for 10 days. Fruits were stored at 10°C, and submitted to “softening index” (IA). The symptoms of early softening disorder were clearly observed on the 4th day after storage. However, the firmness decrease in DAP fruits happened between the 2nd and 8th day at 10°C, with a decrease of 71% of initial firmness, presenting an atypical behavior for fruits stored under refrigeration. There was no difference between fruits with DAP and without DAP for soluble solids, titratable acidity and ascorbic acid content. Besides that, there was no difference between fruits with DAP and without DAP for respiration rate and ethylene production under refrigerated storage, which suggests that the disorder occurrence is not related to an increase in ethylene in the postharvest period. The results indicate a strong association between early softening disorder and changes in the cell wall composition. The cell wall polymers fractionation show that the yield of water soluble polymers (FSA) and NaOH soluble polymers (FSH) was higher in fruits with DAP than on fruits without DAP during the entire storage period. The smallest level of the imidazole soluble fraction (FSI) in DAP fruit, on day 0, may be related to a higher activity of pectinmethylesterase. The decrease in cellulose-rich polysaccharides (CEL) in the DAP fruit suggest modifications in the cellulose-hemicellulose domain. Ethylene production did not follow cell wall modification, suggesting that changes in the cell wall structure could be happening during fruit growth. DAP fruit presented an AIA level 6 times smaller than fruit without DAP, in day 0, without storage differences. Possibly, AIA levels in DAP fruit were reduced while fruits were still connected to the plant. The disorder may be related to cell wall changes and to AIA level. Should a hormonal change occur during fruit development – i. e. prior to harvesting -- and still depending on fruit sensibility to hormonal signaling, cell wall changes could have different intensities, which determine if the fruit will or not have the flesh early softening observed after harvest.

Keywords: Fruit softening; Physiological disorder; Cell wall enzymes; Cell wall fractionation; *Carica papaya* L.

1 INTRODUÇÃO

O mamão é um fruto altamente perecível e apresenta uma série de distúrbios que afetam sua qualidade pós-colheita, muitos dos quais determinados por fatores pré-colheita. Alguns distúrbios, como a mancha fisiológica e a geleificação já vêm sendo estudados e suas causas estão parcialmente elucidadas. Entretanto, outros problemas, como o amolecimento precoce, ainda não foram estudados. Este distúrbio ocorre em algumas épocas do ano, com predominância no verão e se caracteriza por um rápido amolecimento da polpa, acompanhado parcialmente pela evolução da coloração da casca. Esta anomalia torna-se mais problemática pela dificuldade de identificar sua presença no fruto verde, uma vez que, no momento da colheita os frutos apresentam coloração da casca e firmeza da polpa característicos do estágio de maturação.

A característica inicial do distúrbio do amolecimento precoce (DAP) no mamão ‘Golden’ é o rápido decréscimo na firmeza da polpa, com nenhuma ou pouca mudança na coloração da casca. Ressalta-se que é um distúrbio não relatado na literatura, apesar de ter sido observado por produtores de mamão. Em casos extremos, foi observada a manifestação do distúrbio durante o procedimento da colheita dos frutos. Jacomino e colaboradores denominaram “amolecimento precoce” por remeter às características observadas após o estudo da perda de firmeza do fruto quando armazenado a 10°C (ANEXO B). Estes frutos apresentam rápido amolecimento da polpa, a qual pode atingir condição de consumo em uma semana. Frutos sem este distúrbio, armazenados sob as mesmas condições, permanecem firmes por várias semanas. O uso do armazenamento refrigerado foi uma forma de demonstrar e maximizar a diferença entre os frutos com e sem o amolecimento precoce da polpa.

Possivelmente, os frutos com este distúrbio apresentam comportamento fisiológico distinto dos frutos “normais”. As consequências deste distúrbio afetam a comercialização do mamão por ocorrer aleatoriamente nos frutos de um mesmo pomar e por não permitir

identificação prévia. Isto resulta na comercialização de frutos que amolecem durante o transporte e acarreta perdas pós-colheita consideráveis.

Por ser um distúrbio cuja característica principal é a rápida perda de firmeza da polpa acredita-se que ocorram modificações na estrutura da parede celular nos frutos com o distúrbio, acompanhadas por diferença na atividade de enzimas de parede celular, já que a polpa dos frutos com o amolecimento precoce não se mantém firme com o armazenamento refrigerado.

O hormônio etileno é considerado o principal sinalizador para praticamente todos os eventos relacionados ao seu amadurecimento e senescência. No entanto está claro que eventos independentes de etileno também ocorrem em frutos climatéricos e que o contrário também é verdadeiro, ou seja, o amadurecimento de frutos não climatéricos compreende eventos dependentes de etileno (BARRY; GIOVANNONI, 2007). Com o desenvolvimento das pesquisas tem-se demonstrado que o etileno pode interagir com outros hormônios e esta interação pode atuar na regulação do amadurecimento de frutos.

De acordo com a hipótese de que existem mecanismos regulatórios adicionais na sinalização do etileno os quais estão envolvidos na promoção do amadurecimento, senescência e abscisão do mamão, sugere-se que uma alteração hormonal durante o desenvolvimento do fruto pode estar correlacionada com a antecipação do amolecimento nos frutos com o distúrbio sendo a alteração da parede celular a modificação mais evidente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar aspectos da fisiologia e bioquímica do amadurecimento do mamão ‘Golden’ visando o entendimento do distúrbio do amolecimento precoce (DAP).

2.2 Objetivo específico

Considerando que o distúrbio do amolecimento precoce apresenta como característica perceptível a perda antecipada de firmeza da polpa, especula-se que este distúrbio esteja ligado a alterações na parede celular. Desta forma, os objetivos específicos foram determinar a relação do distúrbio do amolecimento precoce com a atividade de enzimas relacionadas à modificação da parede celular, constituição da parede celular, e alterações hormonais que pudessem auxiliar no entendimento da perda de firmeza precoce da polpa em mamões ‘Golden’.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cultura do mamoeiro

O Brasil é o maior produtor mundial de mamão com produção de 1.900.000 toneladas por ano. Desse total, 32.000 toneladas são exportadas. O cultivo do mamão é praticado em quase todo o território brasileiro, concentrando-se na Bahia (48,2%) e no Espírito Santo (36,7%) (FNP, 2009). As maiores empresas produtoras e exportadoras de mamão do Brasil encontram-se na região norte do Estado do Espírito Santo e exportam tanto para os Estados Unidos quanto para Europa.

O mamão é um fruto bastante comercializado e, por ser muito sensível ao ataque de patógenos, injúrias mecânicas e outros fatores abióticos (BALBINO, 2003), está vulnerável às perdas pós-colheita durante o manuseio e armazenamento (GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2003). Segundo Vilas Boas (2000), aproximadamente 22% do mamão produzido no Hawaii apresentaram danos mecânicos durante o transporte, o que possibilitou a infestação por patógenos. Cerqueira-Pereira (2009) observou que mamões embalados em caixa de papelão e transportados em caminhão refrigerado apresentaram menor incidência de injúria mecânica quando comparados àqueles transportados em caixas de madeira em caminhão coberto com lona.

O mamoeiro é uma planta que extrai quantidades relativamente altas de nutrientes do solo e apresenta exigências contínuas durante o primeiro ano. A sua característica de colheitas contínuas a partir do início de produção mostra que a planta necessita de suprimentos de água e nutrientes em intervalos freqüentes de modo a permitir o fluxo contínuo de produção de flores e frutos (COELHO; OLIVEIRA, 2003). Por ser uma planta exigente em relação às condições de clima e solo, o mamoeiro desenvolve-se melhor em solo areno-argiloso, com pH variando de 5,5 a 6,7 (DIAS et al., 2007) em locais de boa luminosidade, com temperaturas entre 21 e 33°C, com níveis de precipitação acima de 1.200 mm anuais e não tolera excesso de umidade no solo (MARIN et al., 1995).

3.2 Estresse

Estresse é geralmente definido como qualquer fator ambiental potencialmente desfavorável a organismos vivos que interrompe, restringe ou acelera os processos metabólicos de forma adversa ou negativa (LEVITT, 1972 apud HODGES; TOIVONEN, 2008). O vegetal está exposto a estresses ambientais, o que demanda respostas plásticas no desenvolvimento, nas características morfológicas, fisiológicas, anatômicas ou reprodutivas, que podem sustentar ajustes funcionais compensatórios para deter os efeitos do estresse (SULTAN, 2003). A plasticidade fenotípica desencadeada pelo estresse é amplamente estudada em relação às fontes de estresse como luz, disponibilidade hídrica ou nutricional (PUIJALON; BORNETTE, 2006).

Segundo Chitarra e Chitarra (2005), dependendo da intensidade ou tempo de exposição do vegetal a um fator externo desfavorável podem ocorrer desordens ou distúrbios fisiológicos de forma que a habilidade do vegetal em responder ao estresse pode determinar a ocorrência ou não de um distúrbio fisiológico. Os distúrbios podem ou não ser reversíveis e ter severidade variável dependendo das características do próprio vegetal como estrutura, composição dos tecidos e genótipo. O amadurecimento, visto como um evento da senescência, também pode ser considerado um fator de estresse dado às inúmeras reações do processo. Os distúrbios fisiológicos são respostas metabólicas dos tecidos vegetais causadas por desequilíbrio nutricional ou hídrico, temperatura ou atmosfera de armazenamento. Os distúrbios fisiológicos normalmente manifestam seus sintomas quando o vegetal está sob armazenamento refrigerado ou após a retirada do produto para o ambiente.

Em frutos com distúrbio fisiológico, comumente se observam modificação da coloração da casca, sabores e odores desagradáveis, depressões superficiais ou manchas na epiderme. Os sintomas são múltiplos e variam de acordo com o produto. Alguns dos distúrbios já relatados na literatura e que entre as causas estão considerados os fatores nutricionais e/ou climáticos, são: “softy nose” e “stem-end breakdown” em mangas, “russeting” e “water core” em maçãs e “blotchy ripening” em tomates, entre outros. Também se observam relatos de tomates com

rachaduras na epiderme que evoluem para enrugamento e descoloração do fruto. Esse sintoma é descrito como “cuticle cracks” e designado como “cara de gato”. Dentre as causas, estão as flutuações na umidade e na temperatura do ar. Também são documentadas as desordens relacionadas ao cálcio, como “bitter pit” em maçã, no qual os tecidos afetados tornam-se secos e esponjosos e “blossom end-rot” em tomate, que corresponde ao colapso das células próximas ao terminal estilar com escurecimento do tecido abaixo da epiderme. Alguns distúrbios foram observados após a colheita do fruto, durante o armazenamento (CHITARRA; CHITARRA, 2005). A perda na qualidade de maçã associada com escaldadura solar, cujo sintoma (coloração marrom a preta na epiderme) se manifestou durante o armazenamento do fruto (WATKINS et al., 1993). Após a remoção do armazenamento no frio se observou lanosidade ou “wooliness” em pêssegos, cuja polpa tem aspecto amarronzado e sem suculência. Em geral quando utilizado conforme as características do produto, o armazenamento refrigerado é uma eficiente forma de conservação. Frutos como maçã, morango e pêra mantêm-se firmes por mais tempo quando armazenados em menores temperaturas (SAMS, 1999).

As avaliações das modificações fisiológicas decorrentes de estresses podem auxiliar no entendimento das mudanças observadas no vegetal e ainda servirem como indicadores de distúrbios fisiológicos.

3.3 Distúrbios fisiológicos no mamoeiro

O mamão apresenta uma série de distúrbios que afetam sua qualidade pós-colheita, muitos dos quais determinados por fatores pré-colheita como tratos culturais (controle de patógenos no campo, adubação) e condições edafoclimáticas. O armazenamento refrigerado também pode desencadear injúria pelo frio dependendo da temperatura e do tempo de exposição. Kader (2002) relatou que os sintomas de injúria pelo frio, comumente encontrados no mamão são manchas amarronzadas e queimaduras na casca, encharcamento dos tecidos (“water soaking”), aumento da incidência de antracnose e pode ocorrer dos frutos não amadurecerem. As temperaturas favoráveis às injúrias pelo frio são relacionadas ao tempo e à temperatura de exposição do fruto,

por exemplo, 10°C durante 14 dias, 7,5°C durante 10 dias ou 2°C por 4 dias. Chen e Paull (1986) observaram que mamões colhidos na maturidade fisiológica apresentaram sintomas de danos por frio como desuniformidade no amadurecimento, aumento de suscetibilidade a fungos e escaldadura da casca após 2 semanas a 7°C.

Qiu e Paull (1995) relataram a importância do cálcio na firmeza da polpa do mamão. Estes autores observaram que a concentração de cálcio no mesocarpo foi positivamente correlacionada com a firmeza da polpa e a taxa de amaciamento do mesocarpo. Menores correlações foram observadas entre a firmeza do fruto e a relação Ca/K ou Ca/Mg ou para Ca/Mg+K. Alguns distúrbios relacionados às condições climáticas também foram relatados.

A mancha fisiológica do mamão foi mencionada por Ishii e Holzmann (1963) em mamões cultivados no Havaí. Na África do Sul foi relatada por Le Roux, 1950 apud Kaiser et al. (1996). As manchas aparecem no fruto como pontos amarronzados sobre a casca. Estes pontos são pouco visíveis nos frutos verdes e mais visíveis quando se inicia o amadurecimento. As manchas prevalecem na superfície abaxial o que fez com que os pesquisadores sugerissem que estivesse associada aos estômatos. Hine et al. (1965) relatou a mancha fisiológica como uma doença de causa desconhecida. Vários experimentos falharam na tentativa de isolar um possível organismo parasítico até que Chan e Toh (1988) relataram que frutos colhidos na estação chuvosa apresentavam maiores manchas, mas não mais numerosas. A partir de então as manchas são reconhecidas como desordem fisiológica e sua ocorrência esporádica indica envolvimento de fatores genéticos e ambientais sem relação com fator biótico (REYES et al, 1994). Campostrini et al. (2005) sugeriram que a mancha fisiológica poderia estar relacionada aos baixos teores de cálcio nos frutos.

Reyes et al. (1994) ainda relataram que mamões que apresentavam cutícula espessa apresentavam mais manchas do que os frutos com cutícula mais fina, sugerindo que a cutícula poderia estar sob tensão durante o crescimento do fruto. Estes autores sugeriram que as manchas estavam fisiologicamente associadas aos últimos estágios de desenvolvimento do mamão e relacionadas à espessura da cutícula. O maior regime de chuvas pode ter aumentado a pressão de

turgor nos vasos laticíferos e o extravasamento do látex sobre a epiderme seria responsável pelas manchas. A ocorrência da mancha fisiológica do mamão apresentou correlação com a amplitude térmica durante o segundo mês antes da colheita do fruto. Fatores climáticos como índice pluviométrico e incidência de radiação, em associação com as características da planta, como capacidade transpiratória e estágio de desenvolvimento dos frutos são determinantes na ocorrência desta anomalia.

Gomes Filho et al. (2008) apontaram o aspecto sazonal de incidência da mancha fisiológica em mamões ‘Tainung 01’, sendo os meses fevereiro, setembro e outubro mais favoráveis a ocorrência de mancha. Estes autores também mencionaram que a amplitude térmica teria participação na ocorrência da mancha fisiológica, uma vez que a amplitude em janeiro foi de 7,2°C e em setembro foi de 10,9°C.

Os fatores nutricionais que antecedem a colheita do fruto também podem estar envolvidos no distúrbio fisiológico chamado gelificação. Esse distúrbio foi relatado por Oliveira et al. (2002) porém suas causas ainda não foram esclarecidas. A gelificação ocorre principalmente em mamões ‘Golden’ e é caracterizada pelo mesocarpo translúcido, com aspecto encharcado. Este distúrbio acomete a integridade funcional da membrana celular sem interferir na integridade física, uma vez que não se observa ruptura da membrana. O aspecto de encharcamento no tecido poder ser resultado do acúmulo de água no apoplasto devido a alguma alteração nos complexos protéicos associados às membranas, impedindo a entrada de água no vacúolo e levando à perda de turgescência celular. Os autores acreditam que o menor conteúdo de potássio e magnésio na polpa de mamão com gelificação interfira na atividade de H⁺ATPases (Oliveira et al., 2002).

3.4 Parede celular e perda de firmeza da polpa

A rigidez que a parede celular fornece à planta é uma adaptação importante para o sucesso na ocupação das plantas superiores ao ambiente terrestre. Dessa forma a parede celular é constantemente remodelada para garantir o próprio crescimento e desenvolvimento, sucesso reprodutivo e defesa contra estresse biótico e ambiental (CARPITA;GIBEAUT, 1993;

HUMPHREY et al., 2007). A complexidade química e a compacta organização da parede celular tornam as plantas altamente recalcitrantes de forma que a estratégia de desconstrução da parede celular possibilita modificações para o desenvolvimento da planta as quais demandam mudanças no tamanho e formato celular ou a abscisão do órgão vegetal (ROSE; BENNETT, 1999; PAULY; KEEGSTRA, 2008; KNOX, 2008). As funções bioquímicas da parede celular incluem a reorganização dos componentes da parede e possivelmente a transdução de sinal em resposta a ataque de patógenos e estresse ambiental (SARKAR et al., 2009). As modificações seletivas da arquitetura da parede celular estão associadas, praticamente, em cada estágio do desenvolvimento. Estas modificações participam do crescimento celular, mas também participam de eventos em órgãos que não necessariamente estão em crescimento, como germinação de sementes, deiscência de anteras, penetração do tubo polínico no pistilo, abscisão de folhas, flores e frutos, desenvolvimento de espaço intercelular e amadurecimento de frutos (GOULAO et al., 2007). O amadurecimento do fruto é um processo fisiológico crucial para as plantas, uma vez que representa o estágio terminal do desenvolvimento que torna o fruto atrativo para vários organismos dispersores de semente. As modificações na bioquímica, fisiologia e estrutura do fruto em amadurecimento influenciam a aparência, textura, sabor e aroma. A perda de firmeza da polpa é um dos resultados dessas alterações decorrentes do amadurecimento e que confere importante significado comercial por ser um atributo de qualidade para a aceitação pelo consumidor. Além disso, o amaciamento excessivo é o principal fator responsável pelas limitações na vida útil, transporte e armazenamento, por favorecer a ocorrência de danos físicos durante o manuseio e por aumentar a suscetibilidade a doenças (GOULAO; OLIVEIRA, 2008).

O amaciamento da polpa é o resultado de extensa modificação na parede celular que ocorre durante o amadurecimento de frutos e envolve mudanças na composição e organização das pectinas, hemiceluloses e polissacarídeos celulósicos da parede celular (DUAN et al., 2008). As mudanças observadas na parede celular ocorrem de forma coordenada com etapas de arranjo e rearranjo. Embora o crescimento tenha cessado, a desorganização seletiva dos componentes da parede celular e separação intercelular são muito pronunciadas durante o amadurecimento de

frutos, determinando o momento da perda da adesão celular e a extensão dessa perda, o que resulta no amaciamento do tecido. Estas modificações são o resultado, pelo menos em parte, da atividade de várias enzimas modificadoras de parede celular envolvidas na perda de parede que promovem a extensão do tecido e crescimento (GOULAO et al., 2007).

No modelo atualmente aceito, a parede celular é composta por moléculas de xiloglucano ligadas por pontes de hidrogênio à celulose, formando um complexo que reforça a parede primária. Esta rede celulose-xiloglucano está embebida em uma matriz péctica composta de poliuronídeos junto a domínios de outros componentes menos abundantes como compostos fenólicos e proteínas estruturais (COSGROVE, 2001; BOOTTEN et al., 2004). Lazan et al. (2004) verificaram que os polímeros da parede celular primária do mamão estão ligados covalentemente e descreveram um modelo pectina-xiloglucano, arabinano, galactano e arabinogalactano. Sañudo-Barajas et al. (2009) observaram que a solubilização de pectinas e a despolimerização de poliuronídeos sobre as mudanças da parede celular ocorreram simultaneamente no amaciamento da polpa do mamão. Estes autores observaram uma correlação direta entre a solubilização de poliuronídeos, a redução da adesão celular e o amaciamento da polpa do fruto.

A vida útil para a comercialização do mamão varia principalmente com o estágio de maturação e com a cultivar, no entanto, geralmente se observa que o fruto atinge condições de consumo em uma semana quando armazenado em condições ambientes. Estudos com mamões de diferentes cultivares demonstraram a rápida perda de firmeza da polpa com o amadurecimento do fruto. Bron e Jacomino (2006) demonstraram que mamões ‘Golden’ colhidos nos estádios 0, 1, 2 e 3 atingiram condição de consumo (firmeza da polpa ≤ 20 N) em 7, 6, 4 e 3 dias, quando armazenados a 23°C. Fabi et al. (2007) observaram que mamões ‘Golden’ colhidos no estágio 2 apresentaram perda acentuada na firmeza da polpa entre o 3º e o 4º dia de armazenamento a 25°C. As variações observadas na parede celular do mamão, decorrentes com o amadurecimento do fruto fazem com que o mamão seja amplamente utilizado em estudos de modificação de parede celular.

3.5 Enzimas de parede celular

Durante o amadurecimento de frutos, a modificação dos polímeros da parede celular é consequência da ação coordenada de enzimas de parede celular como a poligalacturonase, pectato liase, pectinametilesterase, endo-(1,4)- β -D-glicanase, β -xilosidase e endo-mananase (BRUMMELL; HARPSTER, 2001). Outras hidrolases associadas à modificação da parede celular e ao amadurecimento de frutos incluem a β -galactosidase e α -arabinosidase, expansinas e a xiloglucano endotransglicosilase (BENNETT; LABAVITCH, 2008).

Atua ainda degradando a parede celular, um conjunto de enzimas que degradam os polímeros de celulose, conhecidas como celulase (HAGERMAN; AUSTINN, 1986; KETSA; DAENGKANIT, 1999; MANRIQUE; LAJOLO, 2004). Tratam-se como celulase, enzimas com atividade β -1,4. A celulase é uma β -D-glicosidase (FISCHER; BENNETT, 1991; SEXTON; PALMER, 1997) que participa da degradação da celulose em glicose juntamente com a endo-1-4- β -glicanase e exo-1-4- β -glicanase ou celobiohidrolase. A ação conjunta dessas enzimas contribui para a perda da firmeza da polpa de frutos por clivar as ligações β -(1,4)-D-glicosil que ocorrem nas microfibrilas de celulose e xiloglicanos (LEVY et al., 2002). O aumento da atividade da β -D-glicosidase no amadurecimento de frutos, foi inicialmente observado em abacate (PESIS et al., 1978) e manga (ABU-SARRA; ABU-GOUKH, 1992). El-Zoghbi (1994) sugeriu a participação da β -D-glicosidase no amaciamento da polpa destes frutos após avaliar a atividade desta enzima concomitantemente com o declínio do conteúdo da celulose.

A enzima pectinametilesterase desesterifica o polímero homogalacturonato no qual o grupo carboxílico encontra-se metilado. Esta enzima atua tanto nas extremidades redutoras como no interior das cadeias pécticas (ABU-SARRA; ABU-GOUKH, 1992). A atuação desta enzima durante o amadurecimento tem sido estudada em muitos frutos climatéricos como kiwi, abacate, pêsego e mamão, em grande parte porque sua ação é necessária em preparar, por desmetilação, o ácido poligalacturônico para atuação de outras enzimas envolvidas no metabolismo da parede celular, como a poligalacturonase. Com o amadurecimento, há a solubilização das protopectinas

pela enzima poligalacturonase e liberação do cálcio pela acidificação da parede celular, através de enzimas pectinolíticas, levando ao enfraquecimento das ligações dos polissacarídeos da parede pelo deslocamento dos íons de cálcio das zonas de junção (SOLE; BÖTTGER, 1981).

Em alguns frutos, a atividade da β -galactosidase aumenta com o amadurecimento e esse aumento está associado à solubilidade e despolimerização das pectinas (LAZAN et al., 2004). Essa enzima remove os resíduos β -galactosil de terminais não redutores de β -1,4-D-galactanos e contribui para o afrouxamento dos poliuronídeos de parede celular (WALLNER, 1978). A perda de açúcares neutros, especialmente galactose, foi observada durante o amadurecimento de frutos, tais como morango, tomates e maçãs, sendo que este declínio foi atribuído à β -galactosidase (CARRINGTON; PRESSEY, 1983). Manrique e Lajolo (2004) observaram aumento de atividade da β -galactosidase e sugeriram a ocorrência de ação conjunta desta enzima com a xiloglucano-endo-transglicosilase (XET) na perda de firmeza da polpa do mamão.

As modificações catalisadas por enzimas sobre a estrutura e a composição da parede celular de mamão são consideradas um importante fator do amolecimento do fruto. Observaram-se perdas de firmeza da polpa do mamão associadas à atividade de enzimas como a poligalacturonase, pectinametilesterase, β -galactosidase, xilanase e celulase (PAULL; CHEN, 1983; LAZAN et al., 2004; MANENOI; PAULL, 2007). Gomez et al. (2002) sugeriram que os carboidratos liberados durante o amadurecimento do mamão são resultantes da modificação da parede celular nesse período. O que se observou em mamões é que a modificação nas pectinas parecem preceder a modificação nas hemiceluloses (CHIN et al., 1999; LAZAN et al., 1995), de forma que, somente a modificação da pectina talvez seja insuficiente para o amaciamento da polpa até que outro componente seja degradado. Paull et al. (1999) apontam que ambos, hidrólise da pectina e modificação da hemicelulose e celulose estão envolvidos no amaciamento da polpa do mamão.

3.6 Regulação hormonal da perda de firmeza

Com o amadurecimento do fruto, o aspecto visual da casca é a primeira característica observada, quando as mudanças de coloração exprimem o processo de degradação das clorofilas, em função das mudanças de pH, de ácidos, do aumento dos processos oxidativos e da ação das enzimas da via de degradação de clorofila e síntese de pigmentos carotenóides e antocianinas, tornando o fruto amarelado após a colheita (TUCKER, 1993).

O etileno está relacionado à diminuição do teor de ácido ascórbico durante o amadurecimento dos frutos climatéricos, (DHILLON et al., 1987; VAZQUEZ-OCHOA; COLINAS-LEON, 1990). Cerqueira-Pereira (2009), porém, observou aumento no teor de ácido ascórbico durante o amadurecimento de mamões ‘Solo’. Quanto ao teor de outros ácidos orgânicos, tende a diminuir durante o processo de amadurecimento devido à oxidação dos ácidos no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, em decorrência da respiração (BRODY, 1996). Segundo Chitarra e Chitarra (2005) o teor desses ácidos é fundamental para a síntese de compostos fenólicos, lipídicos e compostos voláteis e a variação da acidez pode ser um indicativo do estágio de maturação do fruto, já que a acidez decresce em função do avanço do amadurecimento.

Durante o amadurecimento, o teor de sólidos solúveis geralmente aumenta devido à biossíntese de novos açúcares e ácidos ou degradação daqueles já existentes (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Os sólidos solúveis representam os compostos solúveis em água presente nos frutos, como açúcares, vitaminas, ácidos, aminoácidos e pectinas. Xisto (2002) não observou alterações significativas no teor de sólidos solúveis em goiabas, no entanto, Singh e Pal (2008) observaram que goiabas ‘Safeda’ armazenadas em temperatura ambiente apresentavam aumento no teor de sólidos solúveis com o amadurecimento. Cerqueira et al. (2009) também observaram aumento no teor de sólidos solúveis em goiabas ‘Kumagai’ armazenadas a 22°C.

Danos mecânicos, apodrecimento e o processo de amadurecimento e senescência promovem a produção autocatalítica do etileno e este hormônio desencadeia reações que resultam na modificação da parede celular, principal responsável pela perda de firmeza do fruto. O

hormônio etileno regula a expressão de genes que codificam as enzimas responsáveis pela modificação da parede celular (WAKABAYASHI, 2000). Segundo Karakurt e Huber (2003), a aplicação de etileno em frutos climatéricos induz ao acúmulo de hidrolases da parede celular. A atividade da celulase em abacates (TUCKER; LATIES, 1984) e da poligalacturonase em tomate (BIGGS et al., 1986) são transcricionalmente reguladas pelo etileno. Em banana, as hidrolases pectinametilesterase, poligalacturonase, celulase e pectato liase são dependentes da produção e da percepção do etileno nos tecidos do fruto durante o amadurecimento (LOHANI et al., 2004).

Embora o etileno desempenhe papel chave no amadurecimento, é muito provável que os mecanismos de controle de tal processo sejam o resultado de uma complexa interação entre o etileno e outros hormônios. O amadurecimento de frutos é considerado por alguns como uma forma especializada da senescência (SEYMOUR, 1993). Um grande número de fatores bióticos e abióticos pode acelerar o processo. Nitsch (1950) demonstrou que o início do crescimento do morango é estimulado por auxina oriunda dos aquênios. Antes do amadurecimento do fruto os níveis de auxina no receptáculo decresceram possivelmente devido à finalização do transporte de auxina a partir dos aquênios o que desencadeia os processos de amadurecimento (GIVEN et al., 1988). Perkins-Veazie et al. (1996) relataram que morangos exibiram um pequeno aumento nos níveis de produção de etileno durante os últimos estádios do amadurecimento. Isso reforça a afirmativa de Aharoni et al. (2002) de que muitos dos processos associados ao amadurecimento são regulados de uma forma discreta, refinada. O amadurecimento comandado por níveis reduzidos de auxina é acompanhado por síntese “de novo” de específicos RNAm que codificam proteínas responsáveis por mudanças drásticas no fruto como pigmentação e textura (MANING, 1998). Em frutos climatéricos como tomate, banana, melão e maçã, por exemplo, o etileno é o sinalizador hormonal que desencadeia o amadurecimento, no entanto, nem todos os processos são etileno-dependentes (LEVIÈVRE et al., 1997).

As mudanças entre as ligações ou associações entre polímeros, como moléculas de xiloglucanos ligados à microfibrila de celulose pode ser uma característica essencial na perda de parede, necessária para expansão celular. Este modelo é suportado pela observação de que um

dos efeitos do crescimento induzido por auxina é a despolimerização e solubilização do xiloglucano (TALBOTT; RAY, 1992). A parede celular durante o desenvolvimento dos frutos sofre modificações relacionadas ao processo de expansão celular. Cavalari (2009) observou que a associação celulose-hemicelulose é desfeita por ação enzimática antes do completo desenvolvimento do mamão e que esse processo facilita o amaciamento da polpa após a colheita. Esse autor sugere que o fruto passa por um processo de preparação da parede celular para atingir a maturidade fisiológica e que as modificações sofridas pela parede, após a maturidade fisiológica do fruto, as tornam menos resistentes, o que é adequado ao consumo. Várias mudanças na arquitetura da parede celular primária têm sido associadas com a ação da auxina, incluindo a acidificação da parede (RAYLE; CLELAND, 1992), modificação de polímeros específicos da parede celular e síntese “de novo” de polissacarídeos (TALBOTT; RAY, 1992). A redução do pH apoplástico parece induzir a perda da parede através da ativação de enzimas modificadoras da parede que catalizam a quebra de ligações e o rearranjo entre os polímeros (CLELAND, 1995).

Eventos independentes de etileno ocorrem em frutos climatéricos e o contrário também é verdadeiro, ou seja, o amadurecimento de frutos não climatéricos compreende eventos dependentes de etileno (BARRY; GIOVANNONI, 2007). Com o desenvolvimento das pesquisas tem-se demonstrado que o etileno pode interagir com outros hormônios e esta interação pode atuar regulando o amadurecimento de frutos.

Uma hipótese para a interação do etileno com a auxina é que os níveis de AIA decrescem para que se inicie o amadurecimento em frutos climatéricos e não climatéricos (YUAN et al., 2001; MEIR et al., 2006). Em maçãs, Mousdale e Knee (1981) detectaram um pico de AIA antes do início da produção de etileno. Posteriormente, Li e Yuan (2008) observaram que a aplicação exógena de ácido naftaleno acético (NAA) em maçãs ‘Delicious’ aumentou a produção de etileno e a expressão de genes relacionados à modificação da parede celular. Buta e Spaulding (1994) observaram que os níveis de AIA em tomates decresceram durante o amadurecimento com os menores níveis antes das mudanças correlacionadas ao início do amadurecimento, como cor da

casca. O mesmo foi observado em pêssegos, cujo amadurecimento foi induzido pelo aumento no conteúdo de auxina, antes do aumento na biossíntese de etileno (TRAINOTTI et al., 2007). Estes autores observaram que muitos genes envolvidos na biossíntese, transporte e sinalização da auxina (receptores, fatores de resposta a auxina e Aux/IAA) apresentaram aumento na expressão no mesocarpo durante o amadurecimento de pêssegos, sugerindo que a auxina esteja ativamente envolvida no amadurecimento de pêssegos o que demonstra interação entre auxina e etileno.

Em outros frutos, porém, o decréscimo no nível de auxina não afetou a produção de etileno. Purgatto et al. (2002) não observaram diferença significativa na produção de etileno em fatias de banana controle e aquelas com aplicação exógena de AIA e sugerem que possivelmente o AIA não interfere na sinalização de etileno durante o período climatérico uma vez que o pico climatérico ocorreu normalmente nas fatias de banana tratadas com AIA. Estes autores observaram anteriormente efeitos da aplicação de AIA sobre a degradação de amido e atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo do amido durante o amadurecimento de bananas (PURGATTO et al., 2001). Frenkel e Dyck (1973) haviam observado retardo na mudança de coloração de peras induzido por AIA, porém sem efeito na síntese de etileno.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta dos frutos

Mamões ‘Golden’ foram colhidos em cultivos comerciais da empresa Caliman Agrícola S/A (latitude sul 19°23'28" e longitude oeste 40°04'20") no norte do Espírito Santo, no período de julho de 2007 a fevereiro de 2009. Foram realizadas 6 coletas as quais seguiram os mesmos parâmetros para a colheita, transporte e armazenamento descritos por Jacomino e colaboradores (ANEXO A). Os frutos foram colhidos no estágio 1 de maturação, o que representa coloração da casca com até 15% da superfície amarela ou ângulo de cor (°H) de aproximadamente 108°. Uma amostra dos frutos colhidos foi utilizada para a caracterização da firmeza da polpa no dia da colheita no laboratório da empresa Caliman Agrícola S/A e os demais frutos foram enviados ao Laboratório de Pós-colheita e Produtos Hortícolas da ESALQ/USP. Este procedimento foi realizado para cada uma das coletas.

Os frutos do lote destinado à ESALQ foram embalados, refrigerados e enviados no mesmo dia a Piracicaba. Os frutos foram transportados em caminhão refrigerado até São Paulo e depois em veículo com ar condicionado até o Laboratório de Pós-colheita e Produtos Hortícolas da ESALQ/USP, onde foram mantidos a $10^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $85\pm 10\%$ UR. No recebimento dos frutos foram realizadas medições de firmeza da polpa para a confirmação de que os frutos coletados apresentavam firmeza semelhante à observada no dia da coleta. O dia 0 de armazenamento referiu-se ao armazenamento a 10°C na ESALQ quando os frutos estavam com 48 h após a colheita. As análises físicoquímicas e fisiológicas foram realizadas a cada 2 dias, durante 10 dias. Amostras de cada fruto foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C para as análises bioquímicas e hormonais. As análises hormonais e parte das análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, em São Paulo.

O armazenamento do mamão a 10°C é necessário para o estudo do distúrbio do amolecimento precoce visto que a diferença na perda de firmeza é maximizada entre os frutos com e sem o distúrbio (ANEXO B). A análise durante 10 dias é suficiente para determinar se o

fruto apresenta o distúrbio do amolecimento precoce pela metodologia do Índice de Amolecimento.

Foram realizadas as análises físicoquímicas (coloração da casca, firmeza da polpa, teores de sólidos solúveis, acidez titulável e ácido ascórbico), as análises fisiológicas (atividade respiratória e a produção de etileno) e as análises bioquímicas (atividade das enzimas β -glicosidase, β -galactosidase e pectinametilesterase e o fracionamento da parede celular). A análise hormonal compreendeu a quantificação dos níveis de auxina endógena (ácido 3-indol acético - AIA).

Adicionalmente, um pomar da empresa produtora foi selecionado e foram marcadas flores na antese para a finalidade de avaliar o perfil hormonal durante o crescimento do mamão. Aproximadamente 400 flores do mamoeiro foram marcadas na antese. A partir de fevereiro de 2008, data da marcação das flores, foram realizadas viagens mensais para a coleta de frutos aos 30, 60, 90, 120 e 150 dias após a antese. A última coleta, aos 150 dias, representou frutos maduros fisiologicamente, equivalentes ao estágio 1 de maturação. Os 20 frutos coletados a cada 30 dias foram transportados em mãos, evitando-se possíveis injúrias durante o transporte.

4.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental para a coleta dos frutos foi inteiramente ao acaso. De cada planta foi colhido 1 fruto para um total de 140 frutos em cada pomar. A cada 2 dias, durante 10 dias de armazenamento, as análises fisiológicas foram avaliadas em 20 frutos sendo que cada fruto constituiu uma repetição.

10 frutos nos quais foram realizadas as análises fisiológicas foram destinados às análises físicoquímicas. Após as análises de firmeza da polpa e determinações do Índice de Amolecimento, amostras da polpa foram congeladas em nitrogênio líquido, de acordo com a presença ou ausência do distúrbio, para as consecutivas análises bioquímicas e hormonais. Para as análises bioquímicas e hormonais foram compostos dois “pool” de amostras, um para os frutos

com o distúrbio e outro para os frutos sem o distúrbio. Foi utilizada a média de 3 repetições para cada dia de armazenamento.

As análises hormonais nos frutos em crescimento seguiram o mesmo planejamento utilizado para os experimentos de pós-colheita, onde a média de 3 repetições foi utilizada para cada data de coleta durante o crescimento dos frutos.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Os cálculos foram realizados através do sistema SAS (software estatístico SAS, versão 9.1).

4.3 Metodologia do Índice de Amolecimento (IA)

A determinação do Índice de Amolecimento foi elaborada e descrita por Jacomino e colaboradores (ANEXO A). Esta determinação baseou-se nos resultados de firmeza da polpa, medidas na região equatorial do fruto. Com base nos dados coletados foram gerados gráficos de firmeza da polpa em função do tempo (dias após a colheita) e as respectivas curvas de tendências para cada gráfico, assumindo o comportamento linear. A inclinação da curva, representada pelo valor de “a” da equação “ $y = ax + b$ ” foi chamada de Índice de Amolecimento (IA).

Frutos com IA superiores a -10 foram considerados sem o distúrbio do amolecimento precoce (DAP) e frutos com IA inferiores a -10 foram considerados com o distúrbio, pois nestes o amolecimento da polpa ocorre em poucos dias. O valor limítrofe para a classificação do tipo de fruto (maior ou menor que -10) foi delimitado a partir do perfil do decréscimo de firmeza, durante 10 dias de armazenamento, após análise de aproximadamente 70.000 frutos amostrados de 8 a 10 pomares acompanhados durante 44 semanas.

Frente às informações geradas previamente por Jacomino e col. foi possível determinar a época de coleta dos frutos de acordo com a época de maior incidência do distúrbio sendo prevista entre fevereiro e maio, quando predominaram os baixos valores de IA, ou seja, frutos com amolecimento intenso. Este período corresponde ao final do verão e praticamente todo o outono

e, coincide com a época relatada pelos produtores como sendo mais propensa à ocorrência de frutos com amolecimento.

As coletas para o presente trabalho se iniciaram em julho de 2007. Em cada coleta foram colhidos aproximadamente 140 frutos por pomar. Frutos foram colhidos de 2 ou 3 pomares para cada uma das 6 coletas compreendidas entre julho de 2007 e fevereiro de 2009. As coletas em que se obtiveram somente frutos sem o amolecimento precoce foram em julho e agosto de 2007. As demais coletas (janeiro, abril e maio de 2008 e fevereiro de 2009) apresentaram frutos com o amolecimento precoce e frutos sem o amolecimento, amostrados de um mesmo lote, sendo que os sintomas mais severos foram observados nas coletas de abril e fevereiro de 2008.

4.4 Análises físicoquímicas

4.4.1 Coloração da casca

A coloração da casca do mamão foi avaliada com colorímetro (Minolta CR 300, Japão) para obtenção do valor do ângulo de cor Hue ($^{\circ}$ H). Os frutos foram avaliados em lados opostos da região de maior diâmetro, tomando-se duas leituras por fruto. Foram utilizadas 10 repetições, sendo cada repetição composta por 1 fruto. Os resultados foram expressos em ângulo de cor ($^{\circ}$ H).

4.4.2 Firmeza da polpa

As determinações de firmeza foram realizadas com penetrômetro digital (53200-Samar TR Turoni, Forli, Itália) na região equatorial do fruto. A firmeza da polpa foi medida com uma ponteira de 8 mm de diâmetro com ponta plana, após a remoção de uma película da casca. Foram utilizadas 10 repetições, sendo cada repetição composta por 1 fruto. Em cada fruto foram realizadas 2 medições em lados opostos da região de maior diâmetro. Os dados foram expressos em Newton (N).

4.4.3 Sólidos solúveis

Uma amostra da polpa localizada na região equatorial do fruto foi homogenizada e o líquido resultante foi avaliado por refratômetro digital (Atago PR-101, Japão) para a obtenção do teor de sólidos solúveis. Foram utilizadas 10 repetições, sendo cada repetição composta por 1 fruto. Foram realizadas 2 leituras para cada fruto. Os resultados foram expressos em °Brix.

4.4.4 Ácido ascórbico

A determinação do teor de ácido ascórbico foi por titulação através da redução do indicador 2,6-diclorofenol-indofenol-sódio (DCFI) pelo ácido ascórbico segundo metodologia descrita para AOAC (1995). 10 g da amostra foram adicionadas em 50 ml de ácido oxálico 1%. A titulação foi efetuada com DCFI 0,02% até atingir a coloração rosada persistente por 15 segundos. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico por 100 g de polpa, através da equação: $[\text{volume DCFI (ml) gasto} \times f \times 100] / \text{massa da amostra}$, onde f é o fator de correção para padronização do DCFI e é obtido através da equação $f = \text{massa de ácido ascórbico} / 10 \times \text{volume de DCFI}$.

4.4.5 Acidez titulável

10 g de amostra foram homogenizadas em 90 ml de água destilada e em seguida a determinação do teor de acidez foi realizada por titulação com hidróxido de sódio (0,1 N) até que a solução indicasse pH 8,1 (ponto de viragem da fenolftaleína) em pHmetro digital (Tecnal, Tec 03 MP). Os cálculos foram realizados segundo AOAC (1995) e os resultados expressos em g de ácido cítrico por 100 g de polpa.

4.5 Análises fisiológicas

4.5.1 Atividade respiratória e produção de etileno

Os frutos foram colocados em recipientes herméticos de vidro com capacidade de 1700 mL, previamente expostos às condições de temperatura e umidade do experimento. Após 1 h,

amostras de 1 mL de gás foram coletadas dos recipientes através de um septo de silicone, com auxílio de uma seringa (Hamilton, Gastight, EUA). As amostras de gases foram analisadas em cromatógrafo Thermo Finnigan Trace 2000GC. Após as medidas, os frutos foram utilizados para as análises físicoquímicas e bioquímicas. O cromatógrafo foi equipado com coluna capilar Porapak N, com 2 m de comprimento e regulada para 80°C, com hidrogênio como gás de arraste (40 mL min⁻¹). Para as análises de respiração (CO₂) foi utilizado metanador a 350°C. As amostras de gases foram analisadas por um detector de ionização de chama a 250°C. A respiração e a produção de etileno foram determinadas pela diferença entre a concentração gasosa inicial e final, sendo expressas, respectivamente, em mL CO₂ kg⁻¹ h⁻¹ e µL C₂H₄kg⁻¹h⁻¹.

4.6 Análises bioquímicas

4.6.1 Extração das enzimas β-galactosidase e β-glicosidase

Para a atividade da β-galactosidase e β-glicosidase, as polpas de mamão congeladas foram trituradas em nitrogênio líquido, seguindo-se a metodologia descrita por Karakurt e Huber (2003). As amostras de 20 g da polpa e 40 mL de etanol a 4°C foram homogeneizadas durante 2 minutos. Uma alíquota de 8 mL do homogenato foi centrifugado (Centrífuga Sigma, 3K30) a 16000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi homogeneizado em 5 mL de etanol 80% gelado e centrifugado novamente. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuspensão em 2 mL de tampão acetato de sódio 25 mM contendo NaCl 1,2 M, em pH 5,0, incubado por 30 minutos a 4°C e, posteriormente, centrifugado a 16000 g por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante obtido foi recolhido e utilizado para dosagens de proteína e para os ensaios enzimáticos.

4.6.1.1 Atividade da β-galactosidase

Para a estimativa da atividade da β-galactosidase (EC 3.2.1.23) utilizou-se o reagente *p*-nitrofenil-β-galactopiranosídeo (Sigma), que após a ação da enzima libera o *p*-nitrofenol, um

produto amarelo. O método utilizado baseou-se na metodologia descrita por Karakurt e Huber (2003). A mistura de reação constituiu-se de uma alíquota de 350 μL da solução de *p*-nitrofenil- β -galactopiranosídeo 6,6 mM em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,2 adicionada a 325 μL de tampão acetato de sódio 25 mM pH 5,0 contendo NaCl 1,2 M. A solução foi previamente incubada a 37°C por 10 minutos. Em seguida se adicionou 25 μL do extrato enzimático. A reação foi interrompida, após 20 minutos de incubação a 37°C, com a adição de 2 mL de NH_4OH 1 M contendo EDTA 2 mM. A absorbância do *p*-nitrofenol liberado foi lida a 410 nm e sua concentração determinada com base em curva-padrão de *p*-nitrofenol, cujo coeficiente de extinção molar é $18,1 \times 10^3$.

4.6.1.2 Atividade da β -glicosidase

Para estimar a atividade da β -glicosidase (EC 3.2.1.17) utilizou-se o substrato sintético *p*-nitrofenil - β -glicopiranosídeo (Sigma) conforme descrito por Schreier e Hartmann-Schreier (1987). Uma alíquota de 900 μL da solução de *p*-nitrofenil- β -glicopiranosídeo 4 mM em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 foi previamente incubada a 37°C por 10 minutos (B. Braun Biotech International, Thermomix, Germany). Em seguida se adicionou 100 μL do extrato enzimático. O meio de reação foi incubado a 37°C por 20 minutos. Ao final desse tempo, a reação foi interrompida com a adição de 2 mL de tampão $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaH}_2\text{CO}_3$ 0,2 M pH 9,8. A absorbância do *p*-nitrofenol, liberado do substrato, foi lida a 410 nm e a concentração calculada com base em curva padrão de *p*-nitrofenol, cujo coeficiente de extinção molar é $18,1 \times 10^3$.

4.6.2 Extração e atividade da enzima pectinametilesterase

A atividade da pectinametilesterase (PME, EC 3.1.1.11) em mamões com e sem o distúrbio do amolecimento precoce foi obtida conforme descrito por Kertesz (1951). Amostras de 10 g de polpa congelada foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 25 mL de NaCl 0,2 N a 4°C. A atividade da pectinametilesterase foi determinada por titulometria de acordo

com a liberação dos grupos carboxílicos ácidos resultantes da ação da enzima. Uma alíquota de 5 mL do extrato homogeneizado foi adicionada a 25 mL de pectina cítrica 1% em NaCl 0,2 N com pH previamente corrigido para 7,0. A titulação foi realizada durante 10 minutos, utilizando-se NaOH 0,01 N para manter o pH 7,0 do extrato enzimático em titulação. A unidade de atividade da PME foi expressa em 1 μ mol de NaOH por grama de polpa por minuto.

4.6.3 Dosagem de proteínas

O método empregado para a quantificação do conteúdo de proteína utilizou albumina de soro bovino como padrão, de acordo com metodologia descrita por Bradford (1976). O ensaio é baseado na observação que a absorbância máxima para a solução do reagente (Coomassie brilliant blue G-250) se modifica de 465 nm para 595 nm quando ocorre a ligação à proteína. As interações hidrofóbicas e iônicas estabilizam a forma aniônica do corante causando uma mudança de cor visível. Uma alíquota de 25 μ L do extrato enzimático foi acrescida de 1 mL da solução de Bradford e, após 10 minutos, a absorbância foi lida a 595 nm.

4.6.4 Fracionamento da parede celular

O fracionamento da parede celular seguiu a metodologia descrita por Carrington et al. (1993), Irwin et al. (2003) e Shiga e Lajolo (2006). 8 g da polpa congelada foram macerados em N₂ líquido, suspensos em 100 mL de clorofórmio:metanol (1:1, v/v) e aquecidos a 70 °C por 30 minutos. As suspensões foram centrifugadas a 8.000 g por 15 minutos e os sobrenadantes descartados. Em seguida, o resíduo foi submetido à remoção de açúcares solúveis em 4 extrações com 30 mL de acetona e centrifugados a 8.000 g por 15 minutos e os sobrenadantes descartados até o embranquecimento do material. Após a remoção dos açúcares solúveis o material da parede celular (MPC) foi extraído com 15 mL de água sob agitação por 1 h a 4°C. Em seguida foram centrifugados a 10.000 g por 10 minutos coletando-se os sobrenadantes. Esse procedimento foi repetido por 3 vezes e o sólido resultante após a diálise em membrana MWCO 3500 e liofilização

referiu-se aos polissacarídeos da fração solúvel em água (FSA). Após a extração dos polissacarídeos da FSA foram adicionados 15 mL de tampão imidazol/HCl 0,5 M pH 7 e mantidos sob agitação por 1 h a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e os resíduos foram lavados com 15 mL de água destilada e centrifugados a 10.000 g por 15 minutos. O material sólido obtido após a liofilização do dialisado resultou na fração de polissacarídeos solúveis no agente quelante imidazol (FSI). Os resíduos insolúveis da extração anterior foram submetidos à extração (1x) com 10 mL de hidróxido de sódio 4 M, com 3 mg/mL de boroidreto de sódio. Em seguida foram mantidos sob atmosfera de nitrogênio por 1 h e centrifugados a 10.000 g por 10 minutos, resultando na fração de polissacarídeos solúveis em NaOH (FSH) que foi neutralizada em banho de gelo com ácido acético glacial. O resíduo resultante, rico em celulose, foi lavado exaustivamente com água destilada, liofilizado e pesado, correspondendo à fração rica em celulose (CEL). As frações extraídas com solução quelante e álcali foram dialisadas e liofilizadas para a estimativa do rendimento dos polímeros da parede.

4.7 Análise hormonal

4.7.1 Extração e quantificação do ácido 3-indol acético (AIA)

O método de extração e purificação parcial do AIA livre nos frutos com e sem o distúrbio do amolecimento precoce foram baseados em Edlund et al. (1995). Aproximadamente 1 g da amostra, macerada em nitrogênio líquido, foi homogeneizada em 30 ml de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0 e 1 µg de padrão interno [$^{13}\text{C}_6$]-AIA (Cambridge Isotopes, Inc.) por 1 hora a 4°C. Posteriormente, o pH foi ajustado para 2,6 com HCl 6,0 N. Adicionou-se ao material 2 g de resina XAD-7 e o manteve sob agitação por 30 minutos. Após 5 minutos de repouso, descartou-se o sobrenadante e o material foi lavado com 30 ml de ácido acético 1%. Após o descarte do sobrenadante, a fração contendo o AIA foi eluída da resina com 50 ml de diclorometano e mantida sob agitação por 1h a 4°C. Após esta etapa o material foi filtrado em um tubo para extração em fase sólida contendo suporte em polietileno (Supelco). O material foi seco

em nitrogênio e recuperado em 400 µl de metanol. O volume final foi reduzido para 50 µl no qual foi adicionado 10 µl do reagente de derivatização (trimetilsilildiazometano – Sigma).

As análises por CG-EM-MSI foram realizadas em cromatógrafo a gás Hewlett-Packard modelo 6890 acoplado a detector por espectrometria de massa modelo 5973. A coluna utilizada para a separação foi HP5MS (30 mts, 0,25 mm diam. interno, 0,25 µm de espessura de filme) tendo hélio como gás carreador com fluxo de 2 ml/min. As injeções foram feitas automaticamente pelo injetor Hewlett-Packard LS-1100 e o volume injetado foi de 3 µl, sem utilização do divisor de amostras (*splitless*) com fluxo de ventilação de 10 ml/min após meio minuto da injeção. A coluna foi mantida a 160°C por 2 minutos, seguida de rampa de temperatura de 4°C/min até 200°C. Foram monitorados os íons com relação massa/carga (m/z) em 130 e 136 correspondentes ao AIA endógeno e 186 e 195 correspondentes ao padrão interno de [$^{13}\text{C}_6$]-AIA. A concentração de AIA endógeno foi obtida pela relação entre as áreas dos picos de AIA nos cromatogramas extraídos em m/z 130 e 136. Os resultados foram expressos em ng de AIA/gPF.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físicoquímica

5.1.1 Coloração da casca e firmeza da polpa

A temperatura de armazenamento a 10°C possibilita visualizar a diferença entre frutos com o amolecimento precoce da polpa daqueles sem o distúrbio, porém, o amolecimento precoce da polpa não pode ser considerado um sintoma de injúria pelo frio, primeiramente porque os frutos sem o distúrbio foram submetidos às mesmas condições de armazenamento (10°C). Além disso, os sintomas são observados em 10 dias, tempo geralmente insuficiente para a manifestação de dano pelo frio. As temperaturas compreendidas entre 9 e 12°C são geralmente as mais utilizadas para o armazenamento do mamão (CHEN; PAULL, 1986). Almeida et al. (2005) observaram sintomas de injúria pelo frio em mamões ‘Golden’, quando os frutos estavam armazenados a 6°C. Além do escurecimento da casca, os autores observaram o aumento da firmeza.

Os frutos com o distúrbio do amolecimento não apresentaram mudança na coloração da casca durante o armazenamento a 10°C (Figura 1). O valor aproximado do ângulo de cor para frutos colhidos no estágio 1, no dia 0 foi de 105°Hue tanto para frutos com o distúrbio quanto para os frutos sem o distúrbio e, ao final do armazenamento a 10°C, a coloração da casca em ambos foi de aproximadamente 102°Hue. Essa característica já havia sido relatada anteriormente em frutos colhidos em 2 estádios de maturação e avaliados quanto à coloração da casca através de uma escala de notas (ANEXO A) onde foi observado que o ponto de colheita não interferiu na ocorrência do distúrbio.

Figura 1 - Coloração da casca (°H) de mamões 'Golden' com e sem o distúrbio do amolecimento precoce armazenados a 10°C. Barras verticais indicam o desvio padrão da média. n=8

A análise do fruto com o distúrbio pode ser realizada em frutos a 23°C, porém, o mamão amadurece rapidamente quando armazenado na temperatura ambiente e os sintomas do amolecimento precoce não são facilmente perceptíveis. Bron e Jacomino (2006) observaram que frutos colhidos com 107°Hue apresentaram 87°Hue no 5º dia de armazenamento a 23°C, ou seja, já amarelados. Quando estão sob refrigeração, mamões 'Golden' apresentam mudança na coloração da casca de forma gradativa.

Os valores médios de firmeza da polpa nos frutos com ou sem DAP demonstraram que tanto os frutos com o distúrbio quanto aqueles sem o distúrbio perderam firmeza durante o armazenamento refrigerado, entretanto aqueles com DAP amoleceram mais intensamente (Figura

2). Vale ressaltar que no dia da colheita, não havia diferença na firmeza da polpa entre os frutos com e sem o distúrbio.

A metodologia do Índice de Amolecimento (IA) demonstrou que frutos com DAP apresentaram IA de -25 enquanto que nos frutos sem DAP o IA foi de -4,6. Os frutos sem o amolecimento precoce mantiveram a firmeza em torno de 120 a 100 N durante todo o armazenamento a 10°C. Os frutos com DAP apresentaram firmeza da polpa semelhante à firmeza avaliada no dia da colheita, aproximadamente 110 N, porém, nos dias seguintes, mesmo sob refrigeração, a perda de firmeza foi progressiva até o fruto apresentar firmeza em torno de 20 N ao final de 10 dias. Em trabalho realizado por Bron (2006), mamões armazenados nas condições ambientes (22°C) atingem condição de consumo quando a firmeza da polpa é ≤ 20 N.

Figura 2 - Linhas de regressão mostram o índice de amolecimento (IA) em mamões 'Golden' com e sem o distúrbio do amolecimento precoce (DAP). Barras indicam o desvio padrão da média. n=8

O sintoma do amolecimento precoce foi observado nitidamente no 4º dia após o armazenamento a 10°C. Observou-se que a perda de firmeza em frutos com DAP ocorreu mais frequentemente entre o 2º e o 8º dia de armazenamento a 10°C, sendo o decréscimo da firmeza equivalente a 71%, comportamento atípico para frutos armazenados sob refrigeração.

Esses resultados confirmaram aqueles obtidos por Jacomino e colaboradores (ANEXO A) de forma que o distúrbio do amolecimento precoce se demonstra grave porque o uso da temperatura baixa não é capaz de manter a firmeza da polpa. Além disso, há a dificuldade em se identificar previamente a presença do distúrbio no fruto recém colhido já que, no momento da colheita, os frutos apresentaram coloração da casca e firmeza da polpa características do estágio de maturação, independente de estarem ou não com o distúrbio.

As mudanças na coloração da casca e perda de firmeza são aquelas mais facilmente observadas durante o amadurecimento do mamão sendo amplamente relatadas na literatura. Wills e Widjanarko (1995) já haviam observado que os maiores decréscimos na firmeza do mamão ocorreram quando os frutos não estavam com a casca totalmente amarelada. O estágio de maturação do fruto, relacionado com a coloração da casca no momento da colheita, influenciou a velocidade da perda de firmeza em mamões ‘Golden’. Segundo Bron e Jacomino (2006) mamões colhidos nos estádios 0, 1, 2 ou 3, apresentaram condições de consumo quando a firmeza da polpa se aproximou de 20 N, o que ocorreu aos 7, 6, 4 e 3 dias a 23°C, respectivamente. Cerqueira-Pereira (2009) observou que mamão ‘Solo’ perdeu 42% da firmeza inicial no 3º dia de armazenamento a 23°C quando os frutos foram embalados em caixas de papelão e transportados em caminhão refrigerado. O decréscimo na firmeza foi mais expressivo, aproximadamente 63% em relação à firmeza inicial, quando os frutos foram embalados em caixa de madeira e transportados em caminhão coberto com lona. O armazenamento refrigerado associado ao manuseio adequado é uma das principais formas de retardar o amadurecimento de frutos.

Mamões com DAP armazenados sob refrigeração apresentaram perda de firmeza semelhante aos frutos sem DAP armazenados no ambiente. No entanto, os frutos com DAP não

apresentaram mudança na coloração da casca. Esse comportamento demonstra que o mamão pode ser um exemplo de fruto no qual a coloração da casca é um evento etileno-independente, diferente das modificações na firmeza da polpa onde as mudanças na parede celular são etileno-dependentes. O etileno afeta a expressão de muitos genes relacionados ao amadurecimento, mas embora menos estudado, a regulação independente de etileno também ocorre em frutos climatéricos (ZEGZOUTI et al., 1997).

A produção de etileno endógeno é uma parte essencial no amadurecimento de frutos climatéricos e provavelmente age como um regulador dos processos etileno dependentes (THEOLOGIS, 1992) e sinalizador molecular para o início do amadurecimento (FLORES et al., 2001). Uma das formas de verificar a dependência por etileno é utilizar um antagonista do etileno como o 1-metilciclopropeno, que interage com os receptores de etileno impedindo as respostas etileno dependentes (SISLER; SEREK, 1997; 2003). Outra forma é o uso de frutos transgênicos. Tomates e melões transgênicos com inibição de etileno têm sido utilizados na discriminação dos processos que não são regulados diretamente por esse hormônio (MURRAY et al., 1993; PECH et al., 2008). Supressão da produção de etileno em melões Charentais demonstrou que coloração da polpa, acúmulo de açúcares e perda de acidez foram independentes de etileno enquanto que o desverdecimento da casca, amaciamento da polpa, desenvolvimento da zona de abscisão peduncular, síntese de aroma e climatério respiratório foram total ou parcialmente dependentes de etileno (GUIS et al., 1997; BAUCHOT et al., 1998; BOWER et al., 2002 apud PECH et al., 2008).

Bron (2006) observou a manutenção da firmeza em mamões tratados com 1-MCP, apesar da perda da cor verde, e sugeriu que o desenvolvimento da cor é menos dependente do etileno quando comparado ao processo de amaciamento da polpa. A perda da cor verde da casca é devida à quebra da estrutura da molécula de clorofila por uma via composta por várias enzimas, dentre elas a clorofilase. O aumento da atividade desta enzima está geralmente associado com a produção de etileno durante o amadurecimento do fruto (TUCKER, 1993). Flores et al. (2001)

relataram que a perda da cor verde em melão é dependente de etileno enquanto que a síntese de pigmentos não.

Pech et al. (2008) sugeriram que o amaciamento da polpa compreende componentes etileno-dependentes e etileno-independentes correlacionados com a regulação dos genes de modificação da parede celular e que a regulação climática e a não climática coexistem durante o amadurecimento de frutos climáticos. Nishiyama et al. (2007) avaliaram a despolimerização dos polissacarídeos da parede celular e a expressão dos genes relacionados ao metabolismo da parede celular em melões transgênicos com supressão da expressão do gene da ACO (1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase) e frutos tratados com 1-MCP. O amaciamento da polpa foi totalmente inibido nos frutos transgênicos porém foi recuperado com etileno exógeno. Os autores também observaram que a aplicação de 1-MCP no início do amadurecimento inibiu a perda de firmeza da polpa, sugerindo que o amaciamento da polpa do melão é etileno-dependente. A cromatografia de exclusão por tamanho dos polissacarídeos da parede celular, nos frutos transgênicos, com ou sem etileno exógeno, indicou que a despolimerização das pectinas e dos xiloglucanos também são etileno-dependentes.

5.1.2 Sólidos solúveis, acidez titulável e ácido ascórbico

As mudanças físico-químicas que ocorrem no amadurecimento do mamão são comumente utilizadas como parâmetros de qualidade do fruto. Considerando que ocorre mudança significativa na firmeza da polpa em frutos com o distúrbio, buscou-se avaliar se o distúrbio acomete outros parâmetros de qualidade.

Mamões com o distúrbio do amolecimento precoce apresentaram no início do armazenamento teores de sólidos solúveis (SS) de 11,8°Brix enquanto que o observado para os frutos sem o distúrbio foi de 12,3°Brix, sendo a diferença entre eles não significativa. Também não se observou diferença significativa durante o armazenamento, uma vez que o valor obtido para frutos com DAP foi de 11,1°Brix enquanto os frutos sem DAP apresentaram teores de

sólidos solúveis de 12°Brix (Figura 3). O armazenamento refrigerado não interferiu nos teores de sólidos solúveis. Observa-se na literatura que os teores de sólidos solúveis em mamões não apresentam variação significativa nem mesmo quando os frutos são armazenados em temperatura ambiente. A determinação do teor de sólidos solúveis por refratometria é uma medida rápida, utilizada como índice de amadurecimento na colheita e amplamente utilizado como parâmetro de qualidade.

Figura 3 - Teores de sólidos solúveis em mamões 'Golden' colhidos no estágio 1 de maturação e armazenados a 10°C durante 10 dias. DAP = Distúrbio do amolecimento precoce. Barras verticais indicam o desvio padrão da média. n= 10

Bron (2006) verificou que não ocorre diferença no teor de SS em mamão 'Golden' durante o amadurecimento a 23°C. Para a cultivar Solo, D'Innocenzo (1996) observou uma variação de 9 a 11° Brix, também sem diferença significativa com o amadurecimento. Cerqueira-Pereira (2009) trabalhou com a mesma cultivar e também observou ausência de diferença

significativa. Para um estudo mais detalhado do processo de adoçamento do fruto durante o amadurecimento são necessárias análises dos teores de sacarose, glicose e frutose (GOMEZ et al., 2002).

O mamão acumula carboidratos solúveis quando o fruto ainda está ligado à planta (CALEGARIO, 1997). Resultados de investigações feitas com mamões quando ligados à planta demonstraram que existe um fornecimento constante de sacarose originada da fotossíntese. Esse processo é interrompido quando o fruto é colhido. Sendo assim, a fonte de carbono para o adoçamento do fruto após a colheita, possivelmente, provém de outro processo, uma vez que o baixo conteúdo de amido acumulado durante o crescimento do fruto não é suficiente como fonte de carbono para o aumento no teor de sacarose nem para o adoçamento no amadurecimento pós-colheita (GOMEZ et al., 1999).

Gomez et al. (2002) observaram que a principal mudança no amadurecimento do mamão foi o decréscimo em galactose e aumento no conteúdo de glicose. Os resultados obtidos, segundo os autores, sugerem que a fonte de carbono para a síntese de sacarose após a colheita do mamão pode ser derivada da galactose, que deve ser rapidamente metabolizada, uma vez que não se observou galactose livre em mamões maduros. Quando os autores avaliaram os principais açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) nos frutos verdes, intermediários e maduros, não observaram diferença significativa entre os estádios de maturação e sugeriram que a percepção do sabor doce se deve ao processo de mastigação que libera hexoses. Além disso, a percepção do sabor doce pode estar relacionada ao desaparecimento do látex, considerado uma característica de fruto verde pelos julgadores de análise sensorial (GOMEZ et al., 2002), e ainda às mudanças nos níveis de compostos fenólicos as quais também contribuem para o sabor (PAULL, 1996). Pressey (1983) observou que as maiores modificações na composição da parede celular, relacionada ao amadurecimento de diversos frutos, entre eles maçã, morango e tomate, estão relacionadas à perda de açúcares neutros, especialmente galactose e arabinose.

Frutos com o distúrbio apresentaram teor de acidez de 0,09% enquanto que os frutos sem o distúrbio apresentaram 0,12%. Apesar do teor de acidez encontrado nos frutos com DAP ser

aproximadamente 30% menor do que observado nos frutos sem o distúrbio não se observou diferença significativa neste parâmetro (Figura 4).

Figura 4 - Teores de acidez titulável em mamões ‘Golden’ colhidos no estágio 1 de maturação e armazenados a 10°C durante 10 dias. DAP = Distúrbio do amolecimento precoce. Barras verticais indicam o desvio padrão da média. n= 10

A mudança no teor de acidez da polpa do mamão também não foi observada quando os frutos amadureceram em temperatura ambiente. Cerqueira-Pereira (2009) não observou mudança na acidez titulável durante o armazenamento de mamões ‘Solo’ a 23°C. Os valores obtidos foram próximos a 0,9%, semelhante ao observado por Bron e Jacomino (2006) no estudo de mamões ‘Golden’. No entanto, alguns frutos apresentam redução na acidez com o amadurecimento pós-

colheita, e em alguns casos ocorre aumento no teor de acidez com o amadurecimento (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

O teor de ácido ascórbico nos frutos com o distúrbio permaneceu praticamente inalterado durante todo o período de armazenamento (Figura 5). O mesmo comportamento foi observado para os frutos sem o distúrbio. Frutos com o amolecimento precoce apresentaram 72 mg 100g⁻¹, valor semelhante ao obtido nos frutos sem o distúrbio (74 mg 100g⁻¹).

Figura 5 - Teores de ácido ascórbico em mamões 'Golden' colhidos no estágio 1 de maturação e armazenados a 10°C durante 10 dias. DAP = Distúrbio do amolecimento precoce. Barras verticais indicam o desvio padrão da média. n= 10

De acordo com a literatura, ocorre aumento no teor de ácido ascórbico durante o amadurecimento de mamões. Selvaraj et al. (1982) relataram que a quantidade de ácido ascórbico em mamões aumentou com o amadurecimento do fruto. Bron e Jacomino (2006) também

observaram aumento de 20 a 30 % no teor de ácido ascórbico em mamões ‘Golden’ independente do estágio de maturação no momento da colheita.

Barata-Soares et al. (2004) relataram que o conteúdo de ácido ascórbico no mamão maduro foi maior que no verde, indicando que há predomínio da síntese durante o amadurecimento do fruto. Os dados desses autores demonstraram que L-galactose, L-galactono-1,4-lactona são precursores eficientes do ácido ascórbico e também que há síntese de ácido ascórbico a partir da manose, galactose e glicose não só para o mamão como também para goiaba de polpa branca e vermelha, morango, brócolis e pimentão verde.

Hancock et al. (2007) citaram três outras alternativas que têm sido propostas para a rota biossintética do ácido ascórbico à rota primária da L-galactose. Estas propostas incluem uma ramificação da rota da L-galactose que utiliza intermediários do ácido L-gulônico, denominada rota da L-gulose, uma rota que sintetiza intermediários do L-gulônico a partir do *myo*-inositol, chamada rota do *myo*-inositol (LORENCE et al., 2004) e a rota proposta por Agius et al. (2003) que utiliza ácido D-galacturônico para síntese de intermediários de L-galactônico, chamada rota do ácido D-galacturônico. De acordo com Vapluesta e Botella (2004) o fluxo através dessa rota é dependente da disponibilidade do substrato D-galacturonato. Este composto apareceria como produto de ‘turnover’ das pectinas da parede celular das células em senescência. Levando-se em consideração que o amadurecimento possa ser um evento da senescência (GOULAO; OLIVEIRA, 2008), o aumento no teor de ácido ascórbico do mamão pode ser resultado da modificação da parede celular que forneceria substrato para a biossíntese de ácido ascórbico.

5.2 Caracterização fisiológica

5.2.1 Atividade respiratória e produção de etileno

A temperatura é um dos fatores de maior influência na respiração. Em frutos climatéricos, o abaixamento da temperatura retarda o pico climatérico e reduz sua intensidade, podendo esse pico ser totalmente suprimido na temperatura próxima ao limite fisiológico. Em alguns frutos, sob baixa temperatura, pode ocorrer desordem fisiológica pelo frio, o fruto não amadurece e pode

ocorrer escurecimento dos tecidos, tornando o fruto impróprio à comercialização (CHITARRA; CHITARRA, 2005). O armazenamento do mamão a 10°C durante 10 dias não desencadeou nenhum tipo de injúria pelo frio. A tolerância do mamão a temperaturas baixas varia com o estágio de maturação e o tempo de exposição ao frio, sendo a temperatura de 10°C bem estabelecida para a conservação pós-colheita, durante a comercialização do fruto, por exercer efeito no controle do amadurecimento. Bron (2006) observou que a refrigeração a 10°C diminuiu o metabolismo dos mamões sem alterações na fisiologia do amadurecimento que poderiam causar algum distúrbio.

A atividade respiratória dos frutos com o distúrbio do amolecimento precoce, armazenados a 10°C foi aproximadamente 3 mLCO₂ kg⁻¹h⁻¹ (Figura 6). Valor semelhante foi observado para frutos sem o distúrbio (3,5 mLCO₂ kg⁻¹h⁻¹). Não houve diferença significativa durante o armazenamento refrigerado de modo que a atividade respiratória não foi superior a 5 mLCO₂ kg⁻¹h⁻¹. O que se observou foi uma redução na produção de CO₂ com o armazenamento a 10°C em comparação ao observado na literatura. O que se observa na literatura é que a atividade respiratória do mamão a 20°C está entre 15 e 35 mL CO₂ kg⁻¹h⁻¹ e diminui para 4 a 6 mL CO₂ kg⁻¹h⁻¹ quando o fruto é transferido para temperatura de 10°C (KADER, 2002).

Sabe-se que a temperatura de armazenamento do fruto influencia no seu metabolismo. As reações enzimáticas, inclusive aquelas relacionadas à respiração ocorrem mais lentamente, contribuindo para o decréscimo da atividade respiratória. Para processos enzimáticos e fisiológicos, o coeficiente Q₁₀, derivado da Lei de Arrhenius, postula que a velocidade dessas reações aumenta de duas a três vezes a cada aumento ou decréscimo de 10°C na temperatura (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Figura 6 - Atividade respiratória em mamões 'Golden' armazenados a 10°C. DAP= distúrbio do amolecimento precoce. Barras verticais indicam o desvio padrão da média. n=20

Ao se avaliar a produção de etileno nos frutos com o distúrbio do amolecimento precoce observou-se reduzida produção de etileno cujos valores não ultrapassaram $0,4 \mu\text{LC}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Figura 7). Uma vez que não foram observadas diferenças na atividade respiratória e, sobretudo, na produção de etileno entre os frutos com e sem DAP, pode-se supor que o aparecimento do distúrbio não se deve a um aumento na produção de etileno, pelo menos não no período pós-colheita, mas possivelmente ocorra na pré-colheita.

Figura 7 - Produção de etileno em mamões 'Golden' armazenados a 10°C. DAP= distúrbio do amolecimento precoce. Barras verticais indicam o desvio padrão da média. n=20

Alguns autores observaram que o armazenamento refrigerado interferiu na produção de etileno. Bron (2006) observou que o armazenamento do mamão a 11°C durante 20 dias não afetou a respiração, mas prejudicou a produção de etileno quando os frutos foram retirados da baixa temperatura e armazenados a 23°C. Bron e Jacomino (2006) observaram um aumento na produção de etileno em mamões 'Golden', somente quando colhidos nos estádios 0 e 1 de maturação, aos 6 dias de armazenamento a 23°C. Estes autores sugeriram que níveis basais de etileno e atividade respiratória são suficientes para estimular as mudanças bioquímicas associadas ao amadurecimento. Estes autores comentaram ainda que devido à complexidade dos processos relacionados à fisiologia do amadurecimento, o comportamento do fruto neste período pode não corresponder aos padrões estabelecidos previamente para frutos climatéricos (WILLS; WIDJANARKO, 1995; SELVARAJ et al., 1982). Cerqueira-Pereira (2009) observou que

mamões 'Solo', em função do sistema de acondicionamento e transporte, apresentaram produção crescente de etileno até o final do armazenamento quando os frutos estavam armazenados a 23°C. Porém, Fabi et al. (2007) observaram comportamento climatérico em mamões 'Golden' armazenados a 25°C.

A supressão da produção de etileno por baixas temperaturas foi descrito em banana e tomate (TAKEDA et al., 1997; MCDONALD et al., 1999). Nair et al. (2004) observaram que mangas armazenadas a 5°C durante 14 dias tiveram baixa atividade da ACC oxidase e ACC sintase mesmo após transferência para temperaturas mais altas, o que pode ter refletido em baixa produção de etileno durante este período. Pode ter ocorrido redução na produção autocatalítica de etileno devido a baixa temperatura de armazenamento, no entanto, o que se verifica pela ausência de diferença significativa é que a produção autocatalítica desse hormônio foi reduzida tanto em frutos sem DAP como em frutos com o sintoma do distúrbio.

De acordo com Levièvre et al. (1997) o amaciamento da polpa é um dos processos do amadurecimento mais sensíveis ao etileno. Brummell e Harpster (2001) destacam o etileno como influenciador da atividade de enzimas que degradam a parede celular. Estas enzimas atuam sobre a parede celular e lamela média reduzindo a firmeza de frutos. A relação entre o etileno e estas enzimas tem sido descrita para vários frutos. Fabi et al. (2007) sugeriram que o impedimento do amaciamento da polpa de mamões tratados com 1-MCP pode indicar dependência das enzimas de parede celular, principalmente aquelas etileno-dependentes como a poligalacturonase, β -galactosidase e pectinametilesterase (BRUMMELL; HARPSTER, 2001).

As modificações na parede celular durante o amadurecimento envolvem ações coordenadas e interdependentes de várias proteínas e enzimas da parede celular (NISHIYAMA et al., 2007). Esses autores observaram que a aplicação de etileno exógeno estimula a desorganização dos polímeros da parede celular de melões e, portanto os genes responsáveis pela modificação da parede celular podem ser semelhantemente regulados. O amaciamento da polpa em frutos climatéricos é regulado pelo etileno, embora não esteja claro quando esta dependência é completa ou parcial. Flores et al. (2001) sugeriram que o amaciamento da polpa pode ser

parcialmente regulado pelo etileno ao observarem que melões transgênicos ACO-suprimidos, tratados com etileno exógeno, apresentaram perda de firmeza da polpa mesmo após a remoção do etileno exógeno.

As rotas metabólicas que determinam a competência para um fruto amadurecer ou os sinais que iniciam o programa de amadurecimento são pouco definidos embora estudos tenham sido realizados. A sinalização do etileno é a rota mais bem definida que direciona as mudanças fenotípicas que ocorrem no amadurecimento. Adicionalmente, a relação do amadurecimento de frutos com outros hormônios tem sido estudada em morango, tomate e uva (GIVEN et al., 1998; MANNING et al., 2006; SYMONS et al., 2006).

É sabido que a auxina pode retardar o amadurecimento de morango e que o tratamento com auxina exógena regula negativamente a expressão de genes específicos do amadurecimento (GIVEN et al., 1988; AHARONI et al., 2002). O ácido giberélico também apresentou efeito inibitório no amadurecimento do morango evidenciado pelo atraso na síntese de antocianina e degradação de clorofila (MARTÍNEZ et al., 1996). Jiang e Joyce (2003) sugeriram que o ácido abscísico tem participação no desenvolvimento de cor em morango através da regulação (up-regulation) da síntese de etileno.

Os frutos com e sem o distúrbio apresentaram produção de etileno reduzida com o armazenamento refrigerado, dessa forma, novamente, se descarta a possibilidade do etileno ter desencadeado as modificações na parede celular durante o armazenamento refrigerado já que os frutos sem o distúrbio estavam submetidos às mesmas condições. Possivelmente outro fator influenciou a desorganização da parede celular e consequentemente a perda de firmeza nos frutos com o distúrbio. Como o etileno regula muitos aspectos do processo do desenvolvimento vegetal, tem sido cada vez mais esclarecido que a diversidade de funções do etileno é alcançada, pelo menos em parte, pela interação com outros hormônios (LIN et al., 2009).

5.3 Caracterização bioquímica

5.3.1 Perfil da atividade de enzimas da parede celular

Observou-se aumento na atividade da β -glicosidase nos frutos com distúrbio do amolecimento precoce do 4º para o 6º dia de armazenamento a 10°C (Figura 8a). O envolvimento de hidrolases da parede celular com a perda de firmeza da polpa tem sido descrito em diversos frutos. Chin et al. (1999) relataram aumento na atividade da celulase com o decréscimo gradativo na firmeza de carambola. Também se observou aumento na solubilização das pectinas com o decréscimo na firmeza de pêra (KETSKA; DAENGKANIT, 1999). Há relatos de baixa atividade da β -glicosidase no amadurecimento de carambola e manga (CHIN et al. 1999; ALI et al., 2004).

O mesmo perfil apresentado para a enzima β -glicosidase foi observado para a β -galactosidase cuja atividade aumentou até o final do armazenamento (Figura 8b). Lazan et al. (1995) observaram que a atividade da β -galactosidase aumenta rapidamente durante os últimos estágios de amadurecimento do mamão, coincidente com o decréscimo mais acelerado na firmeza. A perda de firmeza tem sido associada com o decréscimo no conteúdo de galactose da parede celular (ROSS et al., 1994).

D’Innocenzo (2001) verificou que há maior quantidade de mRNA para β -galactosidase em mamão ‘Solo’ no estágio 2 e que ocorreu decréscimo na atividade da enzima nos estágios posteriores. Pesquisas com mamão da cultivar Eksotika demonstraram que as isoformas I, II e III da enzima β -galactosidase têm a capacidade de modificar pectina e hemicelulose da parede celular do mamão (LAZAN et al., 2004). Balasubramaniam et al. (2005) também observaram atividade significativa da β -galactosidase I durante o amadurecimento de carambola. Ali et al. (2004) em estudo comparativo do amaciamento da polpa de diferentes frutos com algumas enzimas da parede celular observaram que a β -galactosidase apresentou perfil de atividade variado com o tipo de fruto. Estes autores observaram que esta enzima parece ter influência significativa no amaciamento da polpa de banana e manga.

A enzima pectinametilesterase (PME) pode indicar mudança da parede celular nos frutos com o amolecimento precoce, uma vez que no dia 0 de armazenamento houve maior atividade da

PME nos frutos com o distúrbio em relação aos frutos sem o amolecimento precoce (Figura 8c). No primeiro dia de armazenamento a atividade da PME nos frutos com o distúrbio foi de 8,9 $\mu\text{mol NaOH g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ valor duas vezes superior ao observado nos frutos sem o distúrbio (4,7 $\mu\text{mol NaOH g}^{-1} \text{ min}^{-1}$). O perfil ascendente da atividade da PME durante o amadurecimento de mamões também foi relatado Paull e Chen (1983) e Lazan et al. (1995).

Bron (2006) observou o acréscimo na atividade da PME em mamões ‘Golden’ durante o período de armazenamento a 23°C. É bem documentado na literatura que a PME participa dos processos de amaciamento da polpa do mamão. Huber (1983) relatou que a desmetilação pela PME aumenta o número de grupos carboxílicos não esterificados que podem facilitar a atividade da PG. O envolvimento do processo de desmetilação das pectinas também foi sugerido por Fisher e Bennett (1991) no estudo do papel do Ca^{2+} na pós-colheita de frutos. A adição ou remoção dos grupamentos metila nos resíduos de ácido galacturônico altera o caráter ácido dos polímeros pécticos, conduzindo a uma menor ou maior capacidade das moléculas para estabelecer interligações iônicas, respectivamente. Dessa forma a modificação no grau de esterificação das pectinas limita a capacidade das moléculas em formar pontes de Ca^{2+} (POWELL et al., 1992). Manrique e Lajolo (2004) observaram uma variação nos níveis de metil esterificação entre diferentes frações pécticas em mamão ‘Golden’, que estaria relacionada à solubilidade da pectina ou mudança na estrutura da matriz.

Mudanças nas enzimas de parede celular têm sido descritas em outras cultivares de mamão produzidas no México, como ‘Sunrise Solo’, ‘Formosa’ e ‘Maradol’. Estas enzimas incluem poligalacturonase, pectinametilesterase, β -galactosidase, xilanase e β -glicosidase (PAULL; CHEN, 1983; LAZAN et al., 1995; MANENOI; PAULL, 2007). Lazan et al. (1995) já havia relatado um aumento na solubilidade e despolimerização de pectinas durante o amadurecimento de mamão. Zhao et al. (1996) descreveu uma importante correlação entre as mudanças na atividade da PG e xilanase, amaciamento da polpa de mamão e um decréscimo na massa molecular da pectina. Cada vez mais os estudos de amadurecimento utilizam o mamão como um modelo para o estudo do amaciamento de polpa devido à facilidade em se detectar as

mudanças estruturais durante seu amadurecimento. D'Innocenzo (1996) estudou a textura da polpa e o comportamento de enzimas de parede celular em mamões 'Solo' irradiados e observou correspondência entre menor atividade da PME e maior firmeza dos frutos. Lazan e colaboradores (1995) avaliaram a atividade da β -galactosidase, poligalacturonase e PME em mamão 'Eksoitika' e constataram que o amaciamento da polpa foi associado ao aumento na atividade dessas enzimas. Mais tarde, Lazan et al. (2004) também relataram o aumento na atividade da β -galactosidase e apontaram a importância desta enzima na modificação das pectinas e hemiceluloses durante o amaciamento da polpa. Fontes et al. (2008) relataram correlação entre a perda de firmeza e o aumento na atividade da PME em mamões 'Sunrise Solo' e 'Tainung'. Gallon et al. (2009) em estudos do amadurecimento de mamões 'Golden' e 'Gran Golden' observaram que as enzimas celulase e β -galactosidase apresentaram correlação com a perda de firmeza da polpa, sendo portanto, enzimas indicativas do padrão de amaciamento da polpa.

O armazenamento refrigerado promoveu um efeito inibitório sobre as enzimas β -glicosidase, β -galactosidase e pectinametilesterase nos frutos sem o distúrbio, uma vez que não apresentaram aumento de atividade durante o armazenamento. Possivelmente porque o metabolismo do fruto foi reduzido. Entretanto, o armazenamento a 10°C não apresentou o mesmo efeito sobre os frutos com distúrbio. A β -glicosidase e a β -galactosidase apresentaram aumento de atividade quando os frutos permaneceram sob refrigeração, e este aumento coincidiu com o decréscimo na firmeza da polpa nos frutos com DAP do 4º para o 6º dia. As enzimas β -glicosidase e a β -galactosidase são, portanto, um indicativo da mudança na parede celular dos frutos com distúrbio.

Figura 8 – Atividade enzimática da β-glicosidase, β-galactosidase e pectinamylesterase em mamões ‘Golden’ com o distúrbio do amolecimento precoce (DAP) ou não. Barras indicam o desvio padrão da média. n=6

Frutos sem o distúrbio mantiveram-se firmes a 10°C e sem mudança de atividade das enzimas de parede. Enquanto que os frutos que apresentaram o distúrbio, além da firmeza decrescer, as atividades enzimáticas indicaram uma possível mudança na parede celular. Os resultados obtidos apóiam o observado por Ali et al. (2004) em postular que as enzimas de parede podem funcionar coletivamente ou sinergisticamente sobre a modificação da parede durante o amadurecimento e amaciamento da polpa de frutos, e que a velocidade e a intensidade do processo depende da arquitetura da parede celular.

O efeito das mudanças enzimáticas sobre a degradação da pectina está associado com mudanças na composição, massa molecular e características estruturais da pectina. A modificação nos polissacarídeos da parede celular já foi relatada em maçã, pêssgo, mamão, tomate e banana, entre outros (SCALZO et al., 2005; MANGANARIS et al., 2006; MANRIQUE; LAJOLO, 2004; DUAN et al., 2008).

5.3.2 Fracionamento da parede celular

Postulou-se que em muitos frutos, o amolecimento da polpa está relacionado à degradação dos polissacarídeos da lamela média e da parede celular primária (AHMED; LABAVITCH, 1980). O aumento nos níveis das enzimas de degradação de parede celular acompanha os processos de amaciamento da polpa. Porém, modificações significativas de polissacarídeos da parede podem ocorrer sem mudança aparente na atividade enzimática. Os resultados observados neste trabalho enfatizam a limitação dos estudos enzimáticos isolados como indicadores de mudanças durante o amadurecimento. Foi observado que as modificações nos polissacarídeos fornecem informações complementares aos estudos enzimáticos durante o processo de amaciamento do mamão.

Com base na solubilidade dos polímeros da parede celular obtiveram-se 4 frações polissacarídicas. A fração solúvel em água (FSA) representa o material polimérico solúvel em água que foi liberado da parede celular, a fração solúvel em imidazol (FSI) corresponde aos polímeros ligados ionicamente à parede e que são solubilizados por agente quelante, como o

imidazol ou CDTA e os polímeros imobilizados por ligações ésteres liberadas por saponificação com NaOH 4M correspondem a fração solúvel em NaOH (FSH). A FSH usualmente contém uma alta proporção de polissacarídeos hemicelulósicos. O material residual insolúvel (CEL) compreende principalmente celulose com alguma proporção de polímeros associados (REDGWELL et al., 1992; ROSE et al., 1998).

Os rendimentos das diferentes frações extraídas do mamão com o distúrbio do amolecimento precoce estão apresentados na figura 9 enquanto que os resultados obtidos para frutos sem o distúrbio do amolecimento precoce estão apresentados na figura 10.

Figura 9 – Rendimento das frações da parede celular da polpa de mamões ‘Golden’ durante o armazenamento a 10°C. Com base na diferença de solubilidade as frações correspondem a polímeros solúveis em água (FSA), polímeros solubilizados por quelante imidazol (FSI), polímeros imobilizados por ligações ésteres liberados por saponificação em NaOH 4M (FSH) e o resíduo insolúvel. Colunas são média de 3 repetições. Barra de erro indica o desvio padrão

Ao se observar o nível da fração solúvel em água verificou-se que o fruto sem o amolecimento precoce leva 4 dias para atingir o mesmo nível de pectina solúvel que o fruto com o amolecimento precoce apresenta no dia 0 (Figuras 9 e 10).

Figura 10 – Rendimento das frações da parede celular da polpa de mamões ‘Golden’ durante o armazenamento a 10°C. Com base na diferença de solubilidade as frações correspondem a polímeros solúveis em água (FSA), polímeros solubilizados por quelante imidazol (FSI), polímeros imobilizados por ligações ésteres liberados por saponificação em NaOH 4M (FSH) e o resíduo insolúvel. Colunas são média de 3 repetições. Barra de erro indica o desvio padrão

Foi observada uma contínua liberação de polímeros da parede celular nos frutos com o distúrbio enquanto que no fruto sem o distúrbio a solubilização da pectina solúvel parece atingir um ‘plateau’. No dia 0, o rendimento da FSA em frutos sem o amolecimento precoce foi de

7,21% e no final do armazenamento foi de 16,6% (Tabela 1). O rendimento da FSA nos frutos com o distúrbio foi superior à observada nos frutos sem o distúrbio durante todo o período pós-colheita. Frutos com o amolecimento precoce apresentaram, no dia 0, valor de 13,08%, equivalente ao valor observado no fruto sem o distúrbio entre o 2º e o 4º dia de amadurecimento. No 8º dia os frutos com amolecimento precoce apresentaram 28% de rendimento na FSA.

Tabela 1 - Rendimento das frações polissacarídicas durante o armazenamento a 10°C de mamões ‘Golden’ sem e com o distúrbio do amolecimento precoce

Dias de armazenamento a 10°C	Classificação do fruto ^b	Rendimento das frações polissacarídicas (%) ^a			
		FSA	FSI	FSH	CEL
0	sem D.A.P	7,2 ± 1,6 b	6,9 ± 1,1 a	12,9 ± 0,5 b	67,1 ± 1,8 b
	com D.A.P	13,1 ± 0,3 a	2,2 ± 0,6 b	18,6 ± 2,2 a	72,0 ± 2,3 a
2	sem D.A.P	10,9 ± 2,1 b	6,8 ± 0,3 a	13,8 ± 0,7 b	68,4 ± 2,6 a
	com D.A.P	18,8 ± 1,2 a	6,4 ± 0,6 a	21,9 ± 3,1 a	52,9 ± 1,6 b
4	sem D.A.P	16,6 ± 1,8 b	8,6 ± 0,8 a	14,0 ± 0,9 a	60,9 ± 2,7 a
	com D.A.P	21,7 ± 1,1 a	5,2 ± 0,7 b	15,1 ± 1,1 a	57,9 ± 0,7 a
8	sem D.A.P	16,6 ± 1,4 b	8,7 ± 0,4 a	13,9 ± 0,9 b	60,9 ± 1,9 a
	com D.A.P	28,0 ± 1,4 a	5,3 ± 0,5 b	20,8 ± 1,2 a	45,9 ± 1,9 b

Valores são médias e desvios padrões de 3 replicatas. Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa ao nível de $P \leq 0,05$.

^a FSA: fração solúvel em água; FSI: fração solúvel em imidazol; FSH: fração solúvel em NaOH 4M; CEL: celulose.

^b DAP = Distúrbio do Amolecimento Precoce

Paull et al. (1999) observaram aumento na fração solúvel em água durante o amadurecimento de mamões ‘Sunset’. Owino et al. (2004) também observaram aumento na quantidade de polissacarídeos extraídos em água durante o amadurecimento de figo.

O rendimento da FSI em frutos sem o distúrbio foi de 6,8% no dia 0 de armazenamento, enquanto que, em frutos com o distúrbio foi de 2,16% para o mesmo período observado (Tabela 1). O menor nível de FSI no tempo 0 nos frutos com o distúrbio é um indicativo de que também pode ocorrer uma mudança significativa no grau de esterificação da pectina (Figura 10). Este

resultado é coerente com a maior atividade de PME no dia 0 nos frutos com o distúrbio (Figura 9c) considerando-se a função desta enzima em desesterificar a pectina dos grupamentos metila do grupo carboxílico dos ácidos galacturônicos (FISCHER; BENNETT, 1991). Shiga et al. (2009) não observaram diferença evidente nos galacturonanos ligados ao cálcio, liberados pelo quelante CDTA durante o amadurecimento de mamão 'Golden', exceto para os frutos tratados com 1-metilciclopropeno (1-MCP) que demonstraram despolimerização de ácido galacturônico.

No caso da fração solúvel em NaOH 4M (FSH), rica em polímeros hemicelulósicos, observou-se um maior rendimento nos frutos com o distúrbio em relação aos frutos sem o distúrbio durante todo o período de armazenamento (Figura 9 e 10). As modificações nessa fração acontecem mais em relação ao tipo de oligossacarídeos que são extraídos durante o amadurecimento, do que propriamente a uma degradação. A composição monossacarídica dos polímeros liberados por álcali 4M avaliada por Shiga et al. (2009) denotou a predominância de xiloglucano, o qual permaneceu inalterado apesar estágio de amadurecimento avaliado (1/4 da casca amarela) ou tratamento (100 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno e 100 $\eta\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP). Este resultado apresentado foi obtido de resíduos provavelmente compostos por celulose, hemicelulose e pectinas altamente ligadas. Da mesma forma que se observaram mais polímeros hemicelulósicos na FSH dos frutos com o distúrbio do amolecimento também se observou maior atividade das enzimas β -glicosidase e β -galactosidase nestes frutos (Figura 8). Estas enzimas, classificadas como glicosidases, hidrolisam ligações de cadeias de β -1,4-D-glicanos. As ligações β -1,4 podem estar presentes em oligossacarídeos de xiloglucano ou de celulose (ROSE; BENNETT, 1999).

Manrique e Lajolo (2004) avaliaram a quantidade de ácidos urônicos e açúcares neutros nas diferentes frações polissacarídicas e observaram que os valores de açúcares neutros obtidos na FSH foram indicativos de degradação de hemicelulose somente nos últimos estádios de maturação. Paull et al. (1999) observaram um decréscimo nos polímeros solúveis em KOH durante amadurecimento de mamão 'Sunset'. Modificações na hemicelulose associadas ao amadurecimento foram relatadas para tomate, morango e melão (HUBER, 1983; 1984; McCOLLUM et al., 1984). Apesar de muitos relatos de solubilização de xiloglucano em frutos

(REDGWELL; FRY, 1993; WAKABAYASHI, 2000; YAKUSHIJI et al., 2001), nenhuma evidência de despolimerização de hemicelulose (xiloglucano) foi observada em mamão (MANRIQUE; LAJOLO, 2002; SHIGA et al., 2009). Manrique e Lajolo (2004) e Ali et al. (2004) sugerem que a degradação de hemiceluloses tem significativa participação no processo de amaciamento da polpa de mamão.

A função das hemiceluloses no processo de amaciamento ainda não é bem esclarecida, em parte porque apresenta um comportamento irregular em diferentes frutos. O principal constituinte de hemicelulose em dicotiledôneas é o xiloglucano (CARPITA; GIBEAUT, 1993). A maioria dos xiloglucanos é formada por blocos contendo 4 unidades de glucose, 3 unidades de xilose, 1, 2 ou nenhuma unidade de galactose e 1 unidade de fucose, sendo esta última somente para xiloglucano de parede primária (BUCKERIDGE et al., 1992). Buckeridge et al. (2000) sugeriram hipóteses sobre outras funções do xiloglucano não somente como polissacarídeo de reserva na parede celular. Acredita-se que uma das funções principais do xiloglucano seja coordenar a organização das microfibrilas de celulose em paredes primárias. Com isso, o controle da forma celular está associado com o domínio celulose-xiloglucano. Pensa-se que a hemicelulose forma uma ponte entre as microfibrilas de celulose e a matriz polissacarídica. De acordo com essa hipótese, as microfibrilas de celulose da parede celular de frutos com o distúrbio do amolecimento precoce não estariam devidamente organizadas pelo xiloglucano para manter o domínio celulose-hemicelulose.

Lima et al. (2004) demonstraram que o peso molecular do xiloglucano é fundamental na interação celulose-xiloglucano porque determina a quantidade de ligações à celulose, sendo aqueles de menor peso molecular os mais interativos. Xiloglucanos são conhecidos por interagir especificamente com celulose devido à sua similaridade da ligação da cadeia principal, ambos apresentam polímeros ligados por β -1,4 (VALENT; ALBERSHEIM, 1974; VINCKEN et al., 1995). Estes e outros autores sugerem que o grau de fucosilação dos xiloglucanos da parede primária tem função importante em tornar o xiloglucano mais interativo com a celulose, ou seja, xiloglucanos fucosilados são mais interativos com celulose do que aqueles não fucosilados

(LIMA; BUCKERIDGE, 2001). Com menos fucose, o xiloglucano da parede dos frutos com o distúrbio interage menos com a celulose deixando a parede celular mais suscetível à ação de hidrolases como β -glicosidase e β -galactosidase.

O rendimento da fração celulose (CEL) decresceu 36% do início ao final do armazenamento no fruto com o distúrbio, enquanto que nos frutos sem o distúrbio esse decréscimo foi de 6% (Figuras 9 e 10). Esse resultado é coerente com a maior atividade da β -glicosidase nos frutos com o distúrbio. Nos frutos sem o distúrbio do amolecimento precoce a atividade da β -glicosidase variou pouco (Figura 9). De acordo com Manrique e Lajolo (2004), as maiores contribuições ao aumento na fração dos polímeros solúveis em água (FSA) ocorrem a partir de material celulósico (CEL) enquanto que menores proporções são provenientes de FSI e FSH. O decréscimo na massa molecular dos polissacarídeos provavelmente aumenta a solubilidade das moléculas, resultando em maiores rendimentos na fração solúvel em água (SHIGA et al., 2009).

Manrique e Lajolo (2004) observaram um decréscimo no resíduo celulose em diferentes estádios de maturação de mamão, porém esse decréscimo foi praticamente constante. Estes autores sugerem que o decréscimo no resíduo de celulose em mamão seja devido ao decréscimo nas quantidades de ácido galacturônico e monossacarídeos não-celulósicos, indicando que uma associação entre polissacarídeos da matriz e da fase microfibrilar podem estar envolvidos no processo de amaciamento da polpa.

Shiga et al. (2009) avaliaram a composição das frações da parede celular de mamões ‘Golden’ e observaram que os polissacarídeos solúveis em água nos frutos no início do amadurecimento foram compostos de ácido galacturônico e galactose e pequenas quantidades de arabinose, enquanto que os polímeros liberados por CDTA foram compostos por ácido galacturônico com pequenas quantidades de resíduos arabinosil e galactosil. Unidades glucosil, xilosil, galactosil e fucosil foram predominantes em polímeros liberados por álcali 4M. Estes autores observaram ainda que o resíduo era essencialmente constituído de glucose e galactose.

A quantificação dos polissacarídeos da parede celular nos frutos com o distúrbio forneceu um indicativo generalizado das modificações nos diferentes grupos de polímeros. Provavelmente, as composições de cada fração da parede celular nos frutos com o distúrbio se apresentariam elevadas em relação ao observado por Shiga et al. (2009) uma vez que foi detectado um maior rendimento das frações nos frutos com o distúrbio em relação aos frutos sem o distúrbio (Tabela 1). De acordo com os resultados apresentados Shiga et al. (2009) ocorre uma massiva solubilização dos galacturonanos de alta massa molecular sem despolimerização excessiva desse componente na parede celular do mamão. Acredita-se que a solubilização de galacturonanos ocorra de forma acentuada nos frutos com o distúrbio do amolecimento precoce.

5.4 Caracterização hormonal

5.4.1 Níveis de auxina em mamões com e sem o distúrbio do amolecimento precoce

Os frutos sem o distúrbio, no dia 0, apresentaram 110 ng de AIA/gPF e em seguida houve decréscimo com o armazenamento. Esse comportamento não foi observado nos frutos com o distúrbio (Figura 11). Os resultados indicaram que somente no 4º dia de armazenamento os frutos sem DAP apresentaram valor semelhante aos frutos com o distúrbio no dia 0 (24 ng de AIA/gPF). Os níveis de auxina nos frutos com DAP foram aproximadamente 6 vezes menor do que frutos sem o distúrbio, no dia 0 de armazenamento.

Pode-se sugerir que o nível de AIA apresentava-se reduzido antes da colheita do fruto uma vez que no dia 0 observou-se diferença significativa no nível de AIA dos frutos com o distúrbio sendo que não houve diferença na firmeza da polpa entre os frutos com e sem o amolecimento precoce no dia 0 (Figura 2).

Figura 11- Níveis de AIA livre em mamões 'Golden' com ou sem o distúrbio do amolecimento precoce durante o armazenamento a 10°C. DAP= Distúrbio do amolecimento precoce. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão (n=3)

Li e Yuan (2008) sugerem que o AIA pode reduzir a sensibilidade ao etileno na zona de abscisão do fruto, aumentando a expressão de genes que codificam receptores de etileno e, portanto reduz a abscisão de frutos.

A perda de firmeza precoce e as mudanças da parede celular nos frutos com o distúrbio podem estar relacionadas com os níveis de auxina uma vez que a produção de etileno dos frutos com DAP não foi diferente da produção observada nos frutos sem o amolecimento precoce (Figura 7). Por algum fator, o AIA considerado inibitório ao amadurecimento foi metabolizado, permitindo que o etileno desencadeasse os processos de amadurecimento possivelmente quando o fruto ainda estava ligado à planta.

O amadurecimento de frutos é um processo geneticamente programado caracterizado por várias eventos fisiológicos e bioquímicos que levam à mudança de cor, textura, sabor e aroma (PRASANNA et al., 2007). O amadurecimento é crucial para as plantas por representar um estágio do desenvolvimento no qual as sementes maduras são liberadas. As modificações de textura, aparência, cor e aroma que ocorrem com o amadurecimento do fruto têm, em termos de evolução, o objetivo de tornar o fruto palatável e atrativo a uma variedade de organismos dispersores da semente (GOULAO; OLIVEIRA, 2008). Um dos motivos para que a planta antecipe o amadurecimento do mamão pode ser a função ecológica de garantir a dispersão da semente frente a um estresse. Para a antecipação da maturidade do fruto é necessário que a programação do amadurecimento seja modificada.

Alguns pesquisadores constataram que para que ocorram os eventos do amadurecimento, deve haver decréscimo no teor de auxina antes do aumento na produção de etileno (YUAN et al., 2001; MEIR et al., 2006). Embora o etileno desempenhe papel chave no amadurecimento, a cada ano diversos pesquisadores comprovam que os mecanismos de controle de tal processo resultam de uma complexa interação entre o etileno e outros hormônios. Os efeitos da auxina no amadurecimento têm sido estudados em diferentes frutos como morango (GIVEN et al., 1988; VILLARREAL et al., 2009) e banana (VENDRELL, 1969; PURGATTO et al., 2001). Miller et al. (1987) observou que a auxina promove a evolução do etileno em pêssego. Em maçãs, Mousdale e Knee (1981) detectaram um pico de AIA antes do início da produção de etileno. O mesmo também foi detectado em melões (DUNLAP et al. 1996). Outros efeitos da auxina sobre o amadurecimento de frutos foram observados por Purgatto et al. (2001) que infiltraram AIA em fatias de banana e avaliaram a degradação do amido com o amadurecimento do fruto. Estes autores observaram que a auxina retardou a degradação de amido em dois dias quando comparado às fatias do controle.

Purgatto et al. (2002) observaram relação entre baixos níveis de AIA e o início da degradação de amido em bananas, sem mudança na produção de etileno, e sugeriram que os níveis de AIA podem ser considerados um dos fatores regulatórios ou pelo menos um

componente que retarda o início do processo de amadurecimento. Català et al. (2000), observaram que durante o desenvolvimento do tomate, a estrutura da parede celular é modificada pela ação de diversas classes de enzimas cujas expressões gênicas são reguladas por diferentes sinais hormonais como auxina e etileno, coordenando o crescimento e o amadurecimento do fruto, respectivamente. Villarreal et al. (2009) observaram que em morangos o tratamento com ácido naftaleno acético (NAA) retardou o acúmulo de antocianinas, reduziu a expressão de *FaPG1* e diminuiu a atividade da poligalacturonase e do seu RNAm. Sabe-se que as auxinas são reguladores negativos do amadurecimento de morangos e que apresentam efeito inibitório sobre vários genes relacionados à parede celular como pectato liase, β -xilosidase e poligalacturonase (BENÍTEZ-BURRACO et al., 2003; MARTÍNEZ et al., 2004; VILLARREAL et al., 2008). Given et al. (1988) haviam observado que a auxina estimulou a expansão do receptáculo do morango durante seu desenvolvimento e posteriormente inibiu o amadurecimento do fruto.

Dado que sinais hormonais coordenam o crescimento e o amadurecimento de frutos, é sabido que existe um balanço hormonal para que o fruto atinja o ponto de colheita. O ponto de colheita significa que o fruto está maturo fisiologicamente e que suas sementes podem ser ecologicamente dispersas no ambiente. Comercialmente, o ponto de colheita tem importância econômica por influenciar no tempo de comercialização e conservação do fruto. Além de significar a obtenção de um fruto com qualidade para o consumidor, principalmente quando se leva em consideração um tipo de fruto como o mamão. Sugere-se neste trabalho que o decréscimo no nível de AIA nos frutos com o distúrbio tenha ocorrido antes da colheita, ou seja, parece que a auxina já foi degradada quando o fruto ainda estava ligado à planta, já que os resultados obtidos mostraram um nível de AIA bastante reduzido no dia 0 e que este nível não se modificou com o amadurecimento do fruto.

5.4.2 Níveis de auxina durante o desenvolvimento de mamões ‘Golden’

Os níveis de auxina durante o desenvolvimento do mamão foram ascendentes. O maior valor de auxina foi observado aos 120 dias após a antese, quando os níveis de AIA atingiram 70

ng de AIA/gPF. Em seguida, aos 150 daa observou-se um decréscimo no nível de AIA para 40 ng/gPF (Figura 12).

Figura 12- Níveis de AIA livre na polpa de mamões 'Golden' durante o desenvolvimento do fruto. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão (n=3)

Não se soube a idade exata dos frutos com e sem DAP no momento da colheita, uma vez que eles não tiveram suas flores marcadas. Porém, sabe-se que o ponto de colheita para o mamão na região norte do Espírito Santo ocorre quando o fruto possui 4 a 5 meses, o que corresponde a 120 ou 150 daa. O nível de AIA apresentado pelo fruto sem o distúrbio no dia 0 é superior ao observado no fruto em desenvolvimento aos 120 daa. Contudo, a melhor forma de se analisar o nível de AIA em ambas as situações é verificar o perfil hormonal. O que se observou é que o perfil de AIA nos frutos em desenvolvimento foi ascendente. Não podemos afirmar se este fruto apresentaria o distúrbio, possivelmente não, uma vez que aos 120 daa o nível de AIA encontrado

foi de 70 ng de AIA/gPF, valor bastante superior ao observado nos frutos com o distúrbio (24 ng de AIA/gPF) no dia 0.

O comportamento ascendente dos níveis de auxina nos frutos em desenvolvimento remete a transformações no fruto, sendo que uma dessas mudanças pode estar relacionada à parede celular. Portanto, os processos de modificação da parede celular são regulados e coordenados para acomodar as mudanças regulatórias do desenvolvimento quanto ao tamanho, formato e função celular. A regulação das modificações da parede celular depende de múltiplos fatores, sejam eles do desenvolvimento, ambiente ou hormonal (BENNETT; LABAVITCH, 2008). Como Cavalari (2009) relatou, existe um período de remodelação de hemiceluloses no mamão em desenvolvimento e que este período está entre 90 e 120 daa. Este período observado por Cavalari coincide com o período de maiores níveis de AIA apresentados na figura 12.

Labavitch e Ray, em 1974, já haviam sugerido a importância dos estudos do controle hormonal na expansão celular, identificando a modificação no xiloglucano como um aspecto crucial no controle do crescimento. Hayashi (1989) em uma detalhada revisão sobre xiloglucanos comentou que as alterações na parede celular de frutos em desenvolvimento envolvem uma intensa e controlada atividade de hidrolases e transglicosilases que culminam no afrouxamento das ligações intra e intermoleculares, auxiliando no crescimento e na expansão celular.

Se algum fator interferir na sinalização hormonal durante o desenvolvimento do mamão, e dependendo da sensibilidade do fruto a esta sinalização, as mudanças na parede celular podem ser de intensidade diferente, o que poderia determinar se o fruto teria ou não o amolecimento precoce.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia do índice de amolecimento (IA) foi comprovadamente eficiente para a identificação de frutos com amolecimento precoce.

A hipótese de que a antecipação da perda de firmeza, denominada amolecimento precoce, observada em mamões 'Golden' esteja relacionada a modificações no metabolismo da parede celular foi reforçada com as análises bioquímicas da polpa do fruto.

Observou-se diferença significativa no perfil das enzimas β -glicosidase, β -galactosidase e pectinametilesterase. Estas enzimas podem ser utilizadas como indicativo da perda antecipada na firmeza da polpa. A enzima pectinametilesterase forneceu indicativo de mudança da parede celular já no início do armazenamento, cuja atividade foi maior nos frutos com amolecimento precoce no dia 0.

Adicionalmente, foram isoladas frações polissacarídicas da parede celular nos frutos com e sem o distúrbio o que possibilitou demonstrar que ocorrem mudanças na estrutura e composição da parede celular nos frutos com amolecimento precoce. Foi evidente, na fração solúvel em água (FSA), que a solubilização de pectinas é antecipada nos frutos com DAP. Também foi possível observar que havia mais polímeros hemicelulósicos na fração solúvel em NaOH 4M (FSH) dos frutos com DAP o que demonstrou maior atividade das enzimas β -glicosidase e β -galactosidase nestes frutos. O rendimento da fração celulose (CEL) apresentou decréscimo acentuado do início ao final do armazenamento no fruto com o distúrbio, resultado equivalente à maior atividade da β -glicosidase nos frutos com o distúrbio do amolecimento precoce. Nos frutos sem o distúrbio a atividade da β -glicosidase variou pouco.

As variações observadas na parede celular entre frutos com e sem o distúrbio, aparentemente não remeteram à produção de etileno pós-colheita uma vez que a produção deste hormônio não diferiu entre frutos com e sem DAP. No entanto, isto não exclui a possibilidade de

que a produção de etileno pode ter aumentado antes da colheita, durante o desenvolvimento do fruto.

Dadas as evidências da literatura sobre a interação do AIA com o etileno para o amadurecimento de frutos, as análises dos níveis de AIA foram realizadas. Os resultados dos níveis de AIA mostram que os frutos com DAP apresentaram níveis 78% menores do que aqueles obtidos nos frutos sem o distúrbio. Vale notar que no dia 0 de armazenamento, quando ainda não é possível observar diferença na firmeza entre os frutos, pôde-se observar diferença significativa entre os níveis de AIA. A diferença expressiva dos níveis de AIA, firmeza da polpa e composição da parede celular denotam alterações que podem ser decorrentes de uma sinalização hormonal. Observou-se ainda que, os frutos apresentam níveis crescentes de AIA durante o crescimento garantindo que o fruto não antecipe seu amadurecimento, a menos que algum fator interfira na programação genética da planta.

Há evidências bastante claras de que várias enzimas do metabolismo de parede celular são reguladas por etileno. Porém, outros sinais devem contribuir para a regulação da expressão gênica de certas enzimas do metabolismo, aparentemente etileno-independentes.

As plantas utilizam hormônios para regular o desenvolvimento e ainda para responder rapidamente a qualquer mudança nas condições ambientais de forma que as estratégias para o controle das respostas hormonais determinam a habilidade do vegetal em responder as variações durante seu desenvolvimento (McCLELLAN; CHANG, 2008). Cavalari (2009) observou que entre 90 e 120 dias ocorrem mudanças na estrutura dos xiloglucanos da parede celular do mamão, de modo que um fator de estresse pode levar ao remodelamento da parede celular.

Os dados pluviométricos demonstraram que os meses onde se coletaram frutos com DAP houve pluviosidade elevada antes da colheita do fruto (ANEXO C). O mês de abril de 2008, por exemplo, cuja pluviosidade média foi de 30 mm, foi precedido por pluviosidade elevada onde se destacou a última semana de fevereiro cujo valor pluviométrico foi de 184 mm. A coleta de 17 de fevereiro de 2009 onde se identificaram frutos com e sem DAP ocorreu em um período cujo

índice pluviométrico foi de 27,8 mm. Esta coleta foi precedida por elevado índice pluviométrico, aproximadamente 30 dias antes, cujo valor foi de 76 mm, 63% superior ao mês anterior.

Os frutos foram colhidos de pomares comerciais onde ocorre o controle nutricional da planta, porém, chuva em excesso pode interferir devido à lixiviação dos nutrientes do solo, dessa forma supõe-se que o índice pluviométrico pode ter envolvimento no amolecimento precoce. Além disso, se observou que frutos de um mesmo pomar podem apresentar o sintoma do distúrbio do amolecimento enquanto outros não. Possivelmente os níveis de AIA nos frutos com DAP estavam reduzidos quando o fruto ainda estava ligado à planta. O distúrbio possivelmente está relacionado à alteração na parede celular e níveis de AIA. Dessa forma, se houver uma alteração hormonal durante o desenvolvimento do fruto e dependendo da sensibilidade do fruto à sinalização hormonal, as mudanças na parede celular podem ser de intensidade diferente, o que determinaria se o fruto teria ou não o amolecimento precoce.

6.1 Direcionamento para futuras análises

A identificação e ocorrência do distúrbio do amolecimento precoce em mamões ‘Golden’, realizada por Jacomino e colaboradores, possibilitaram outros questionamentos a respeito da regulação do amadurecimento do mamão e o mecanismo de modificação da parede celular. O efeito do AIA em retardar o amadurecimento tem sido estudado em muitos frutos, porém nenhum estudo foi observado em mamões. Para se verificar o efeito da auxina no amadurecimento do mamão e sua relação com a perda de firmeza, fatias do fruto poderiam ser infiltradas com o hormônio e mantidas em condições controladas até o amadurecimento. O método de infiltração com AIA foi utilizado em bananas e foi significativo em demonstrar que o AIA pode retardar a degradação de amido, possivelmente afetando a atividade de enzimas como a β -amilase (PURGATTO et al., 2001).

Para avaliar se houve alguma produção precoce de etileno nos frutos no tempo 0, seria interessante medir o nível de ACC pouco antes da colheita. Também seria interessante medir a atividade de ACC oxidase e avaliar a expressão de ACS e ACO. A técnica de determinação do

ACC usando cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-MS) foi descrita por Perrson e Näsholm (2001) para detecção em plantas.

Estudos de caracterização da parede celular de frutos com o distúrbio seriam interessantes na determinação da concentração de açúcares neutros e ácidos urônicos nas frações polissacarídicas. Estas análises poderiam mostrar as modificações nas proporções de monossacarídeos durante o amaciamento da polpa nos frutos com o distúrbio.

Outra possibilidade para aprofundar os estudos sobre o padrão de modificação da parede celular dos frutos com o distúrbio seria realizar análises de filtração em gel, as quais poderiam revelar a relação entre o tamanho do polímero e o grau de amaciamento do tecido, de forma a comparar possíveis diferenças na estrutura fina da parede celular. A metodologia para a realização destas análises foi descrita por Shiga et al. (2009).

Para se comprovar o efeito do índice pluviométrico na manifestação do distúrbio devem ser realizados experimentos de campo na região produtora, nos quais as plantas sejam submetidas a diferentes lâminas de irrigação. Como a ocorrência do distúrbio é mais freqüente após elevado índice pluviométrico, pode-se monitorar a firmeza da polpa de frutos armazenados a 10°C, principalmente daqueles frutos que durante seu crescimento passaram por elevada pluviosidade semanas antes de completar 90 ou 120 dias após a antese.

REFERÊNCIAS

- AGIUS, F.; GONZÁLEZ-LAMOTHE, R.; CABALLERO, J.L.; MUÑOZ-BLANCO, J.; BOTELLA, M.A.; VALPUESTA, V. Engineering increased vitamin C levels in plants by over-expression of a D-galacturonic acid reductase. **Nature Biotechnology**, London, v. 21, n. 2, p. 177-181, 2003.
- AHMED, A.; LABAVITCH, J. M. Cell wall metabolism in ripening fruit. I. Cell wall changes in ripening 'Bartlett' pears. **Plant Physiology**, Rockville, v. 65, p. 1009-1013, 1980.
- ALI, Z.M.; CHIN, L.H.; LAZAN, H. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. **Plant Science**, Amsterdam, v. 167, p. 317-327, 2004.
- ALMEIDA, R.F. de, RESENDE, E.D. de, VITORAZ, L.; CARLOS, L.A.; PINTO, L.K.A.; SILVA, H.R.F. da.; MARTINS, M.L.L. Injúria pelo frio em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) cv 'Golden'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 17-20, 2005.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Food composition, additives, natural contaminants. In: _____. **Official methods of analysis of AOAC International**. Washington: AOAC International, 1995. chap. 37, p. 1-23.
- BALASUBRAMANIAM, S.; LEE, H.C.; LAZAN, H.; OTHMAN, R.; ALI, Z.M. Purification and properties of a β -galactosidase from carambola fruit with significant activity towards cell wall polysaccharides. **Phytochemistry**, New York, v. 66, p. 153-163, 2005.
- BALBINO, J.M.S. Colheita, pós-colheita e fisiologia do amadurecimento do mamão. In: MARTINS, D.S.; COSTA, A.F.S. da. **A cultura do mamoeiro: tecnologia de produção**. Vitória: INCAPER, 2003. cap. 13, p. 403-439.
- BARATA-SOARES, A.D.; GOMEZ, M.L.P.A.; MESQUITA, C.H.; LAJOLO, F.M. Ascorbic acid biosynthesis: a precursor study on plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 16, n.3, p. 147-154, 2004.
- BARRY, C.S.; GIOVANNONI, J.J. Ethylene and fruit ripening. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 26, p. 143-159, 2007.
- BENÍTEZ-BURRACO, A.; BLANCO-PORTALES, R.; REDONDO-NEVADO, J.; BELLIDO, M. L.; MOYANO, E.; CABALLERO, J. L.; MUÑOZ-BLANCO, J. Cloning and characterization

of two ripening-related strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 633-645, 2003.

BENNETT, A.B.; LABAVITCH, J.M. Ethylene and ripening regulated expression and function of fruit cell wall modifying proteins. **Plant Science**, Amsterdam, v. 175, p. 130-136, 2008.

BOOTTEN, T.J.; HARRIS, P.J.; MELTON, L.D.; NEWMAN, R.H. Solid-state ¹³C-NMR spectroscopy shows that the xyloglucans in the primary cell walls of mung bean (*Vigna radiate* L.) occur in different domains: a new model for xyloglucan-cellulose interactions in the cell wall. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 571-583, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Maryland, v. 72, p. 248-259, 1976.

BRON, I.U. **Amadurecimento do mamão ‘Golden’**: ponto de colheita, bloqueio da ação do etileno e armazenamento refrigerado. 2006. 66 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2006.

BRON, I.U.; JACOMINO, A.P. Ripening and quality of ‘Golden’ papaya fruit harvested at different maturity stages. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 3, p. 389-396, 2006.

BRUMMELL, D.A.; HARPSTER, M.H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 77, p. 311-340, 2001.

BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A. Mobilization of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, p. 141-156, 2000.

BUCKERIDGE, M.S.; ROCHA, D.C.; REID, J.S.G.; DIETRICH, S.M.C. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorffii* from savanna and forestry populations. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 84, p. 145-151, 1992.

BUTA, J.G.; SPAULDING, D.W. Changes in indole-3-acetic-acid and abscisic-acid levels during tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) fruit development and ripening. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 13, p. 163-166, 1994.

CALEGARIO, F.F. **Características físicas e químicas do fruto do mamão (*Carica papaya* L.) em desenvolvimento**. 1997. 54 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997).

CAMPOSTRINI, E.; LIMA, H.C.; OLIVEIRA, J.G. de ; MONNERAT, P.H.; MARINHO, C.S. Teores de Ca e variáveis meteorológicas: relações com a incidência da mancha fisiológica do mamão no norte fluminense. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 4, p. 601-613, 2005.

CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary-cell walls in flowering plants – consistency of molecular-structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, p. 1-30, 1993.

CARRINGTON, C.M.S.; GREVE, C.; LABAVITCH, J.M. Cell wall metabolism in ripening fruit. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, p. 429-434, 1993.

CATALÀ, C.; ROSE, J.K.C.; BENNETT, A.B. Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 527-534, 2000.

CAVALARI, A.A. **Modificações da parede celular de frutos do mamoeiro (*Carica papaya* L.) em diferentes estádios de desenvolvimento**. 2009. 74 p. Tese de (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

CERQUEIRA, T.S.; JACOMINO, A.P.; SASAKI, F.M.; AMORIM, L. Controle do amadurecimento de goiabas ‘Kumagai’ tratadas com 1-metilciclopropeno. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 3, p. 687-692, 2009.

CERQUEIRA-PEREIRA, E.C. **Caracterização e comparação de sistemas de embalagem e transporte de mamão ‘Solo’ destinado ao mercado nacional**. 2009. 114 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

CHAN, Y.K.; TOH, W.K. Resistance to papaya fruit freckles among three breeding lines and their hybrids. **Mardi Research Journal**, Malasia, v. 16, p. 103-107, 1988.

CHEN, N.M.; PAULL, R.E. Development and prevention of chilling injury in papaya fruit. **Journal of American Society for Horticulture Science**, Alexandria, v. 114, n. 4, p. 639-643, 1986.

CHIN, L.H.; ALI, Z.M.; LAZAN, H. Cell wall modifications, degrading enzymes and softening of carambola fruit during ripening. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, p. 767-775, 1999.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

CLELAND, R.E. Auxin and cell elongation. In: DAVIES, P.J. (Ed.). **Plant hormones**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 214-227.

COELHO, E.F.; OLIVEIRA, A.M.G. Fertirrigação do mamoeiro. In: MARTINS, D.S. **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória: INCAPER, 2003. cap. 15, p. 239-250.

DIAS, M.S.C.; CANUTO, R.S.; PACHECO, D.D.; MARTINS, R.N.; SILVA, J.J.C. Mamão (*Carica papaya* L.). In: PAULA JÚNIOR, J. de; VENZON, M. (Ed.). **101 culturas: manual de tecnologias agrícolas**. Viçosa: EPAMIG, 2007. p. 469-478.

D'INNOCENZO, M. **Comportamento de enzimas da parede celular e textura da polpa relacionados ao tratamento de irradiação em mamões (*Carica papaya* L. cv. Solo) durante o amadurecimento**. 1996. 85 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1996.

_____. **Evolução da atividade e expressão de enzimas e modificação de polímeros da parede celular em mamões durante o amadurecimento**. 2001. 118 p. Tese (Doutorado em Bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

DUAN, X.; CHENG, G.; YANG, E.; YI, C.; RUENROENGKLIN, N.; LU, W.; LU, Y.; JIANG, Y. Modification of pectin polysaccharides during ripening of postharvest banana fruit. **Food Chemistry**, Washington, v. 111, p. 144-148, 2008.

DUNLAP, J.R.; SLOVIN, J.P.; COHEN, J.D. Indole-3-acetic-acid, ethylene and abscisic acid metabolism in development muskmelon (*Cucumis melo*) fruit. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 19, n. 1, p. 45-54, 1996.

EDLUND, A.; EKLÖF, S.; SUNDBERG, B.; MORITZ, T.; SANDBERG, G. A microscale technique for gas chromatography-mass spectrometry measurements of picogram amounts of indole-3-acetic acid in plant tissues. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 1043-1047, 1995.

FABI, J.P.; CORDENUNSI, B.R.; BARRETO, G.P.M.; MERCADANTE, A.Z.; LAJOLO, F.M.; NASCIMENTO, J.R. do. Papaya fruit ripening: response to ethylene and 1-methylcyclopropene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, p. 6118-6123, 2007.

FLORES, F.; BEN AMOR, M.; JONES, B.; PECH, J. C.; BOUZAYEN, M.; LATCHÉ, A.; ROMOJARO, F. The use of ethylene-supressed lines to assess differential senitivity to ethylene of the various pathways in Cantaloupe melons. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 113, p. 128-133, 2001.

FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO. Mamão. In: _____. **AGRIANUAL 2009**: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo, 2009. p. 349-356.

FONTES, R.V.; SANTOS, M. P.; FALQUETO, A.R.; SILVA, D.M. Atividade da pectinametilesterase e sua relação com a perda de firmeza da polpa de mamão cv. Sunrise Solo e Tainung. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 54-58, 2008.

FISHER, R.L.; BENNETT, A.B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 675-703, 1991.

FRENKEL, C.; DYCK, R. Auxin inhibition of ripening in Bartlett pears. **Plant Physiology**, Rockville, v. 51, p. 6-9, 1973.

GALLON, C.Z.; BROETTO, S.G.; SILVA, D.M. Atividade da celulase e β -galactosidase no estudo da firmeza da polpa de mamões 'Golden' e 'Gran Golden'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p. 1178-1183, 2009.

GIOVANNONI, J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. **Annual review of plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p.725-749, 2001.

GIVEN, N.K.; VENIS, M.A.; GRIERSON, D. Hormonal regulation of ripening in strawberry, a non-climateric fruit. **Planta**, Berlin, v. 174, p. 402-406, 1988.

GOMES FILHO, A.; OLIVEIRA, J.G. de; VIANA, A.P.; PEREIRA, M.G. Mancha fisiológica e produtividade do mamão 'Tainung 01': efeito da lâmina de irrigação e cobertura do solo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1161-1167, 2008.

GOMEZ, M.L.P.A.; LAJOLO, F.M.; CORDENUNSI, B.R. Metabolismo de carboidratos durante o amadurecimento do mamão (*Carica papaya* L. cv. 'Solo'): influência da radiação gama. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 246-252, 1999.

_____. Evolution of soluble sugars during ripening of papaya fruit and its relation to sweet taste. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n.1, p. 442-447, 2002.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A.; BUTA, J.G.; WANG, C.Y. Methyl-jasmonate and modified atmosphere packaging (MAP) reduce decay and maintain postharvest quality of papaya 'Sunrise'. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 28, p. 361-370, 2003.

GOULAO, L.F.; SANTOS, J.; SOUSA, I.; OLIVEIRA, C.M. Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 43, p. 307-318, 2007.

GOULAO, L.F.; OLIVEIRA, C.M. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. **Trends in Food Science and Tecnology**, Cambridge, v. 19, p. 4-25, 2008.

HANCOCK, R.D.; WALKER, P.G.; PONT, S.D.A.; MARQUIS, N.; VIVERA, S.; GORDON, S.L.; BRENNAN, R.M.; VIOLA, R.L. Ascorbic acid accumulation n fruit of *Ribes nigrum* occurs by *in situ* biosynthesis via the L-galactose pathway. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 34, p. 1080-1091, 2007.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p. 139-168, 1989.

HINE, R.B.; HOLTZMANN, O.V.; RAABE, R.D. **Diseases of papaya**. Honolulu: Hawaii Agricultural Experiment Station, 1965. 26 p. (UH Bulletin, 15).

HODGES, D.M.; TOIVONEN, P.M.A. Quality of fresh-cut fruits as vegetables as affected by exposure to abiotic stress. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 48, p. 155-162, 2008.

HUBER, D.J. Polyuronide degradation and hemicellulose modifications in ripening tomato fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, p. 405-409, 1983.

_____. Strawberry (*Fragaria ananassa*) fruit softening, the potential roles of plyuronides and hemicelluloses. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, p. 1310-1315, 1984.

HUMPHREY, T.V.; BONETTA, D.T.; GORING, D.R. Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors. **New Phytologist**, London, v. 176, p. 7-21, 2007.

IRWIN, D.C.; CHENG, M.; XIANG, B.; ROSE, J.K.C.; WILSON, D.B. Cloning, expression and characterization of a family-74 xyloglucanase from *Thermobifida fusca*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 270, n. 14, p. 3083–3091, 2003.

ISHII, M.; HOLTZMANN, O.V. Papaya mosaic disease in Hawaii. **Plant Disease Report**, St. Paul, v. 47, p. 947-951, 1963.

JACOMINO, A. P.; KLUGE, R. A. BRACKMAN, A.; CAMARGO e CASTRO de, P. R. Amadurecimento e senescência de mamão com 1-metilciclopropeno. **Scientia Agricola**, v.59, n.2, p.303-308, 2002.

KADER, A.A. **Papaya**. 2002. Disponível em: <<http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Fruit/papaya.shtml>>. Acesso em: 16 dez. 2009.

KARAKURT, Y.; HUBER, D.J. Activities of several membrane and cell-wall hydrolases, ethylene biosynthetic enzymes, and cell wall polyuronide degradation during low-temperature storage of intact and fresh-cut papaya (*Carica papaya*) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 28, p. 219-229, 2003.

KERTESZ, Z.I. Pectic enzymes. In: _____. **The pectic substances**. Geneva: Interscience Publ., 1951. chap. 14, p. 333-375.

KETSKA, S.; DAENGKANIT, T. Firmness and activities of polygalacturonase, pectinesterase, b-galactosidase and cellulase in ripening durian harvested at different stages of maturity. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 80, p. 181-188, 1999.

KNOX, J.P. Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, p. 308-313, 2008.

LABAVITCH, J.M.; RAY, P.M. Turnover of cell wall polysaccharides in elongating pea stem segments. **Plant Physiology**, Rockville, v. 53, p. 669-673, 1974.

LAZAN, H.; SELMAT, M.K.; ALI, Z.M. B-galactosidase, polygalacturonase and pectinesterase in differential softening and cell-wall modification during papaya fruit. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 95, p. 106-112, 1995.

LAZAN, H.; NG, S-Y.; GOH, L-Y.; ALI, Z.M. Papaya β -galactosidase/galactanase isoforms in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, p. 847-853, 2004.

LEVIÈVRE, J.M.; LATCHÉ, A.; JONES, B.; BOUZAYEN, M.; PECH, J.C. Ethylene and fruit ripening. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 101, p. 727-739, 1997.

LIN, Z.; ZHONG, S.; GRIERSON, D. Recent advances in ethylene research. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 12, p. 3311-3336, 2009.

LIMA, D.U.; BUCKERIDGE, M.S. Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 46, p. 157-163, 2001.

_____. Xyloglucan-cellulose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 42, p. 389-394, 2004.

LOEWUS, F.A.; MURTHY, P.P.N. *myo*-Inositol metabolism in plants. **Plant Science**, Amsterdam, v. 150, p.1-9, 2000.

LORENCE, A.; CHEVONE, B.I.; MENDES, P.; NESSLER, C.L. *myo*-Inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, p. 1200-1205, 2004.

MANENOI, A.; PAULL, R.E. Papaya fruit softening endoxylanase gene expression, protein and activity. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 131, p. 470-480, 2007.

MANGANARIS, G.A.; VASILAKAKIS, M.; DIAMANTIDIS, G.; MIGNANI, I. Diverse metabolism of cell-wall components of melting and non-melting peach genotypes during ripening after harvest or cold storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, p. 243-250, 2006.

MANNING, K.; TOR, M.; POOLE, M.; HONG, Y.; HOMSON, A.J.; KING, G.J.; GIOVANNONI, J.J.; SEYMOUR, G.B. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. **Nature Genetics**, New York, v. 38, p. 948-952, 2006.

MANRIQUE, G.D.; LAJOLO, F.M. FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 25, p. 101-109, 2002.

_____. Cell-wall polysaccharide modifications during postharvest ripening of papaya fruit (*Carica papaya*). **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 33, p. 11-26, 2004.

MARIN, S.L.D.; GOMES, J.A.; SALGADO, J.S.; MARTINS, D.S.; FULLIN, E.A.
Recomendações para a cultura do mamoeiro dos grupos Solo e Formosa no Estado do Espírito Santo. 4. ed. Vitória: EMCAPA, 1995. 57 p.

MARTÍNEZ, G.A.; CHAVES, A.R.; AÑÓN, M.C. Effect of exogenous application of gibberellic acid on color change and phenylalanine ammonia-lyase, chlorophyllase, and peroxidase activities during ripening of strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 15, p. 139-146, 1996.

MARTÍNEZ, G.A.; CHAVES, A. R.; CIVELLO, P. M. b-xylosidase activity and expression of a b-xylosidase gene during strawberry fruit ripening. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, p. 89-96, 2004.

MCDONALD, R.E.; MCCOLLUM, T.G.; BALDWIN, E.A. Temperature of water heat treatments influences tomato fruit quality following low temperatures storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 16, p. 147-155, 1999.

MEIR, S.; HUNTER, D.A.; CHEN, J.C.; HALALY, V.; REID, M.S. Molecular changes occurring during acquisition of abscission competence following lowering auxin depletion in *Mirabilis jalapa*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, p. 1604-1616, 2006.

MILLER, A.N.; WALSH, C.S.; COHEN, J.D. Measurement of indole-3-acetic-acid in peach fruits (*Prunus persica* L Batsch cv Redhaven) during development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 2, p. 491-494, 1987.

MOUSDALE, D.M.A.; KNEE, M. Indolyl-3-acetic acid and ethylene levels in ripening apple fruits. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 32, n. 129, p.753-758, 1981.

MURRAY, A.J.; HOBSON, G.E.; SCHUCH, W.; BIRD, C.R. Reduced ethylene synthesis in EFE antisense tomatoes has differential effects on fruit ripening processes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 2, p. 301-313, 1993.

NAIR, S.; SINGH, Z.; TAN, S.C. Chilling injury in relation to ethylene biosynthesis in 'Kensington Pride' mango fruit. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Kent, v. 79, p. 82-90, 2004.

NISHIYAMA, K.; GUIS, M.; ROSE, J.K.C.; KUBO, Y.; BENNETT, K.A.; WANGJIN, L.; KATO, K.; USHIJIMA, K.; NAKANO, R.; INABA, A.; BOUZAYEN, M.; LATCHE, A.; PECH, J.C.; BENNETT, A.B. Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 6, p. 1281-1290, 2007.

OLIVEIRA, J.G.; CAMPOSTRINI, E.; BRESSAN-SMITH, R.; CUNHA, M. da ; TORRES NETTO, A; COSTA, E.S.; COUTINHO, K.S.; GOMES, M.M.A; PEREIRA, M.G. Gelificação da polpa de frutos de mamão (*Carica papaya* L.) da variedade 'Golden': caracterização de uma anomalia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Anais eletrônicos...** Belém: SBF, 2002. 1 CD-ROM.

OWINO, W.O.; NAKANO, R.; KUBO, Y.; INABA, A. Alterations in cell wall polysaccharides during ripening in distinct anatomical tissue regions of the fig (*Ficus carica* L.) fruit.

Postharvest Biology and Technology, Amsterdam, v. 32, p. 67-77, 2004.

PAULL, R.E.; CHEN, N.J. Postharvest variation in cell wall-degrading enzymes of papaya (*Carica papaya* L.) during fruit ripening. **Plant Physiology**, Rockville, v. 72, p. 382-385, 1983.

_____; CHEN, N.J.; GROSS, K.; QIU, Y. Changes in papaya cell walls during fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 16, p. 79-89, 1999.

PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. **The Plant Journal**, Oxford, v. 54, p. 559-568, 2008.

PECH, J.C.; BOUZAYEN, M.; LATCHÉ, A. Climateric fruit ripening: ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. **Plant Science**, Amsterdam, v. 175, p. 114-120, 2008.

PERSSON, J.; NÄSHOLM, T. A CG-MS method for determination of amino acid uptake by plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 113, p. 352-358, 2001.

POWELL, D.A.; MORRIS, E.R.; GIDLEY, M.J.; REES, D.A. Conformations and interactions of pectins – 2. Influence of residue sequence on chain association in calcium pectate gels. **Journal of Molecular and Biology**, London, v. 155, p. 517-531, 1992.

PRESSEY, R. α -galactosidase in ripening tomatoes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 71, p. 132-135, 1983.

PUIJALON, S.; BORNETTE, G. Phenotypic plasticity and mechanical stress: biomass partitioning and clonal growth of an aquatic plant species. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 93, n. 8, p. 1090-1099, 2006.

PURGATTO, E.; LAJOLO, F.M.; NASCIMENTO, J.R.O.; CORDENUNSI, B.R. Inhibition of α -amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. **Planta**, Berlin, v. 212, p. 823-828, 2001.

PURGATTO, E.; NASCIMENTO, J.R.O.; LAJOLO, F.M.; CORDENUNSI, B.R. The onset of starch degradation during ripening is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 159, p. 1105-1111, 2002.

QIU, Y.; NISHINA, M.S.; PAULL, R.E. Papaya fruit growth, calcium uptake, and fruit ripening. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, n. 2, p. 246-253, 1995.

RAYLE, D.L.; CLELAND, R.E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, p. 1271-1274, 1992.

REDGWELL, R.J.; FRY, S.C. Xyloglucan endotransglycosylase activity increases during kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) ripening (implications for fruit softening). **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, p. 1399-1406, 1993.

REDGWELL, R.J.; MELTON, L.D.; BRASCH, D.J.; CODDINGTON, J.M. Structures of the pectic polysaccharides from the cell walls of kiwifruit. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 226, p. 287-302, 1992.

REYES, E.M.Q.; PAULL, R.E. Skin freckles on solo papaya fruit. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 58, p. 31-39, 1994.

ROSE, J.K.C.; BENNETT, A.B. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 4, p. 176-183, 1999.

ROSS, G.S.; WEGRZYN, T.; MACRAE, E.A.; REDGWELL, R.J. Apple β -galactosidase. Activity against cell wall polysaccharides and characterization of a related cDNA clone. **Plant Physiology**, Rockville, v. 106, p. 521-528, 1994.

SAMS, C.E. Preharvest factors affecting postharvest texture. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 15, p. 249-254, 1999.

SAÑUDO-BARAJAS, J.A.; LABAVITCH, J.; GREVE, C.; OSUNA-ENCISO, T.; MUUY-RANGEL, D.; SILLER-CEPEDA, J. Cell wall disassembly during papaya softening: role of ethylene in changes in composition, pectin-derived oligomers (PDOs) production and wall hydrolases. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 51, p. 158-167, 2009.

SARKAR, P.; BOSNEAGA, E.; AUER, M. Plant cell walls throughout evolution: towards a molecular understanding of their design principles. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 3, p. 3615-3635, 2009.

SCALZO, R.L.; FORNI, E.; LUPI, D.; GIUDETTI, G.; TESTONI, A. Changes of pectic composition of 'Annurca' apple fruit after storage. **Food Chemistry**, Washington, v. 93, p. 521-530, 2005.

SCHREIER, P.; HARTMANN-SCHREIER, J. Properties of b-glicosidase from *Carica papaya* fruit. **Food Chemistry**, Washington, v. 26, p. 201-212, 1987.

SELVARAJ, Y.; SUBRAMANYAN, M.D.; IYER, C.P.A. Changes in the chemical composition of four cultivars of papaya (*Carica papaya* L.) during growth and development. **Journal of Horticultural Science**, Bangalore, v. 5, p. 135-143, 1982.

SINGH, S.P.; PAL, R.K. Response of climacteric-type guava (*Psidium guajava* L.) to postharvest treatment with 1-MCP. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 47, n. 3, p. 307-314, 2008.

SISLER, E.C.; SEREK, M. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, p. 577-582, 1997.

_____. Compounds interacting with the ethylene receptor in plants. **Plant Biology**, Berlin, v. 5, p. 473-480, 2003.

SHIGA, T.M.; LAJOLO, F.M. Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) – composition and structure. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 63, p. 1-12, 2006.

SHIGA, T.M.; FABI, J.P.; NASCIMENTO, J.R.O.; PETKOWICZ, C.L.O.; VRIESMANN, L.C.; LAJOLO, F.M.; CORDENUNSI, B.R. Changes in cell wall composition associated to the softening of ripening papaya: evidence of extensive solubilization of large molecular mass galacturonides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, p. 7064-7071, 2009.

SULTAN, S.E. Phenotypic plasticity for plant development, function and life-history. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, p. 537-542, 2006.

SYMONS, G.M.; DAVIES, C.; SHAVRUKOV, Y.; DRY, I.B.; REID, J.B.; THOMAS, M.R. Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 150-158, 2006.

TAKEDA, Y.; YOZA, K.I.; NOGATA, Y.; KUSUMOTO, K.I.; VORAGEN, A.G.J.; OHTA, H. Putrescine accumulation in banana fruit with ripening during storage. **Phytochemistry**, New York, v. 46, p. 57-60, 1997.

TALBOTT, L.D.; RAY, P.M. Changes in molecular size of previously deposited and newly synthesized pea cell wall matrix polysaccharides. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, p. 369-379, 1992.

THEOLOGIS, A. One rotten apple spoils the whole bushel – the role of ethylene in fruit ripening. **Cell**, Cambridge, v. 70, p. 181-184, 1992.

TRAINOTTI, L.; TADIELLO, A.; CASADORO, G. The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 3299-3308, 2007.

VALENT, B.S.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. V. On the binding of xyloglucan to cellulose fibers. **Plant Physiology**, Rockville, v. 54, p. 105-108, 1974.

VALPUESTA, V.; BOTELLA, M.A. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, n.12, p.573-577, 2004.

VENDRELL, M. Reversion of senescence: effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic and indoleacetic acid on respiration, ethylene production and ripening of banana fruit slices. **Australian Journal of Biological Science**, Collingwood, v. 22, p. 601-610, 1969.

VILAS BOAS, E.V.B. **Perdas pós-colheita**. Lavras: UFLA; FAEPE, 2000. 64 p.

VILLARREAL, N.M.; MARTÍNEZ, G.A.; CIVELLO, P.M. Influence of plant growth regulators on polygalacturonase expression in strawberry fruit. **Plant Science**, Amsterdam, v. 176, p. 749-757, 2009.

VILLARREAL, N.M.; ROSLI, H.G.; MARTÍNEZ, G.A.; CIVELLO, P.M. Polygalacturonase activity and expression of related genes during ripening of strawberry cultivars with contrasting fruit firmness. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 47, p. 141-150, 2008.

VINCKEN, J.P.; KEIZER, A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.J. Fractionation of xyloglucan fragments and their interaction with cellulose. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 1579-1585, 1995.

WAKABAYASHI, K.; CHUN, J.P.; HUBER, D.J. Extensive solubilization and depolymerization of cell wall polysaccharides during avocado (*Persea americana*) ripening involves concerted action of polygalacturonase and pectinmethylesterase. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 10, p. 345-352, 2000.

WATKINS, C.; HARKER, R.; BROOKFIELD, P.; TUSTIN, S. Maturity of Royal Gala, Braeburn and Fuji – the New Zealand experience. In: WASHINGTON TREEFRUIT POSTHARVEST CONFERENCE, 9., 1993, Wenatchee. **Annals...** Wenatchee, 1993. p. 16-19.

WILLS, R.B.H.; WIDJANARKO, S.B. Changes in physiology, composition and sensory characteristics of Australian papaya during ripening. **Austrian Journal of Experimental Agriculture**, Victoria, v. 35, p. 1173-1176, 1995.

YAKUSHIJI, H.; SAKURAI, N.; MORINAGA, K. Changes in cell wall polysaccharides from the mesocarp of grape berries during veraison. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 111, p. 188-195, 2001.

YUAN, R.; HARTMOND, U.; KENDER, W.J. Physiological factors affecting response of mature 'Valencia' oranges to CMN-pyrazole. II. Endogenous concentrations of indole-3-acetic acid, abscisic acid and ethylene. **Journal of the American Society for Horticulture Science**, Alexandria, v. 126, p. 420-426, 2001.

ZEGZOUTI, H.; JONES, B.; MARTY, C.; LELIÈVRE, J.M.; LATCHE, A.; PECH, J.C.; BOUZAYEN, M. ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive LEA-like protein; characterization and expression in response to drought, ABA and wounding. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, p. 847-854, 1997.

ZHAO, M.; MOY, J.; PAULL, R.E. Effect of gamma-irradiation on ripening papaya petin. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 8, p. 209-222, 1996.

ANEXOS

ANEXO A - Artigo submetido à Revista Brasileira de Fruticultura em 15/09/09

Occurrence and characterization of Early Softening disorder in ‘Golden’ papaya fruit¹

Angelo Pedro Jacomino^{2*}, Camilla Zanotti Gallon³, Ianesmara Soares Dias⁴, Walter Sergio Pinto Pereira⁵

¹Apoio: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ/USP), Rohm and Haas Química Ltda, Caliman Agrícola S.A.

²Engº.Agr. Prof. Dr. Departamento de Produção Vegetal, Laboratório de Pós-colheita, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, c.p9- 13.418-900, Piracicaba, São Paulo, Brasil. jacomino@esalq.usp.br

³Bióloga, Doutoranda do PPG Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, c.p 9 - 13.418-900, Piracicaba, São Paulo, Brasil. Bolsista FAPESP. millazg@gmail.com

⁴EngºAgr. Assergro Assessoria e Serviços LTDA, Rodovia BR 262, Km 6. s/n, Cariacica, Espírito Santo, Brasil. ianesmara@hotmail.com

⁵Engº.Agr. Msc. Rohm and Haas Química Ltda, Av. Nações Unidas, 12.551, 04.578-903, São Paulo, Brasil. wpereira@agrofresh.com

Abstract- The occurrence of green skin and soft pulp in ‘Golden’ papaya fruit during certain seasons has been reported by orchards in northern Espírito Santo state, Brazil. The objective of this study is to characterize and determine the occurrence of this disorder, which will be referred to as ‘Early Softening’. Fruits were harvested weekly for 11 months. The fruits were stored at 10°C, and then pulp firmness and skin color were analyzed. The results of the firmness test were submitted to regression analysis assuming a linear relationship. The slope of the curve is called the ‘softening index’. Fruits with Early Softening are characterized by a loss of firmness in less than 10 days, even when stored under refrigeration. Although softened, the skin of the fruit remains partially green. Fruits with the disorder occur more frequently from mid-summer to mid-autumn. It is not possible to distinguish Early Softening disorder fruits from those without the disorder by skin color and pulp firmness analysis at the time of harvest.

Index Terms: Physiological disorder, Pulp softening, Softening index, *Carica papaya* L.

Ocorrência e caracterização do Distúrbio do Amolecimento Precoce em mamões ‘Golden’

Resumo- Tem sido relatado por produtores da região Norte do Espírito Santo a ocorrência de mamões ‘Golden’ com casca verde e polpa mole, em determinadas épocas do ano. O objetivo

deste trabalho foi caracterizar e determinar a ocorrência deste distúrbio, aqui denominado de amolecimento precoce. Foram realizadas coletas semanais durante 11 meses. Os frutos foram armazenados a 10°C e analisados quanto à firmeza da polpa e à coloração da casca. Os resultados de firmeza da polpa foram submetidos à análise de regressão assumindo-se que a equação é do tipo linear e a inclinação da curva foi chamada de Índice de Amolecimento (IA). Frutos com o distúrbio caracterizaram-se pela perda da firmeza em menos de 10 dias, mesmo quando armazenados sob refrigeração. Embora amolecidos, a coloração da casca manteve-se parcialmente verde. A maior frequência de frutos com o distúrbio ocorreu de meados de verão a meados de outono. Não é possível distinguir frutos com o distúrbio do amolecimento precoce daqueles normais pela análise da coloração da casca e da firmeza da polpa, no momento da colheita.

Termos para indexação: Distúrbio fisiológico, Amolecimento da polpa, Índice de amolecimento, *Carica papaya* L.

Introduction

Brazil is the third largest fruit producer in the world and is presently the world's largest papaya producer. In 2005, papaya production was equivalent to more than 30 million dollars, becoming the sixth most valuable fresh fruit export for Brazil (Fao, 2006). Brazilian papaya production has increased by 65% between 1993-1995 and 2003-2005, according to the United Nations Organization for Agriculture and Food. This increase in production has guaranteed Brazil the top spot among the world's major papaya producers. Brazil is also the world's second largest exporter, and exports have increased from 15.709 tons a year in 1999 to 26.596 tons in 2007 (Ibraf, 2007).

The largest Brazilian papaya plantations are located in Espírito Santo (66 t.ha⁻¹ in 2005), Bahia (53 t.ha⁻¹) and Ceará (42 t.ha⁻¹) (Souza, 2007). The main variety that is grown for export is 'Golden', from the Solo group, with fruits of about 450 g (Martins & Costa, 2003). The fruits are harvested at stage 0 (zero) (green skin) and stage 2 (16% to 25% of the fruit with yellow skin).

Since they are shipped by sea, the papayas will not be consumed until at least 20 days after harvest.

Papaya is a climacteric fruit and is highly perishable due to fast ripening and decay. Papaya is also subject to a series of factors that affect its quality after harvesting, many of which can be determined before harvesting. Some factors, like skin freckles and gellification, are under current study, and their causes have been partially determined (Eloísa et al., 1994; Campostrini et al., 2005).

Skin freckles in papaya were first reported by Ishii & Holzmann (1963) in Hawaii. Climatic factors like the quantity of rain and incident radiation are associated with characteristics of the plant such as transpiration capacity and the developmental stage of the fruits. Together, these are determining factors in the occurrence of skin freckles anomaly (Reyes et al., 1994). These factors can also cause the physiological anomaly called gellification, which affects the physical integrity of the cellular membrane. Gellification occurs mainly in 'Golden' papaya and is characterized by a translucent mesocarp with a drenched aspect (Oliveira et al., 2002). These authors suggest that a possible dysfunction in the cellular membranes alters the osmotic gradient of the tonoplast.

Other sporadic disorders that affect the quality of the fruit have not yet been studied, such as the Early Softening of the fruit pulp. Producers and workers in northern Espírito Santo have reported that, at certain times of the year, it is common to find fruits with green skin and soft pulp. Such fruits are found more often between mid-summer and mid-autumn. In extreme situations, the fruits soften while still on the tree, before they are harvested. These fruits are discarded during the packaging process. In other situations, the fruits seem normal during harvesting but soften during maritime shipping. In preliminary studies by Jacomino and collaborators at ESALQ/USP, inhibition of ethylene action in papaya fruit by 1-methylcyclopropene (1-MCP) resulted in different responses. Papaya with a tendency towards Early Softening responded less to the use of 1-MCP. The objective of this study is to determine

the characteristics of Early Softening in 'Golden' papaya and to follow its occurrence over 11 months.

Materials and Methods

Area description and plant material

'Golden' papaya fruits were harvested weekly in several commercial orchards in northern Espirito Santo, Brazil (latitude 19°23'28" south and longitude 40°04'20" west), from September 2004 to July 2005. Eight orchards in full production were selected; the orchards had distinct characteristics such as age, microclimate and soil. The orchards were irrigated by dripping water and the mineral needs were supplied by irrigation and foliar fertilizers. These orchards were subject to quality control for export. Plants to be used in the experiment were marked in each orchard.

Papaya fruit were harvested at the following stages: stage 1 (up to 15% of the skin with a yellow color) and stage 2 (16% to 25% of the skin with a yellow color). Approximately 100 fruits in stage 1 and 100 fruits in stage 2 were harvested weekly and subjected to the same procedures as fruits for export, i.e., storage at $10\pm 1^{\circ}\text{C}$ and $85\pm 5\%$ UR for 12 days.

Pulp firmness

The pulp firmness of the papaya fruits was analyzed every two days. Pulp firmness was determined by an 8 mm digital diameter penetrometer (53200-Samar, Tr-Turoni, Forli, Italy). Four measurements were taken for each fruit at points equally distant from the middle of the fruit after the skin was removed. The results are expressed in Newtons.

Skin color

The color of the skin was determined every two days by comparison with the scale of colors established by the Brazilian Ministry of Integration (Brazil, 2000). Fruit maturation stages vary from 0 to 5, where 0 means 100% green skin, 1 means up to 15% of the skin with a yellow color, 2 means up to 25% of the skin with a yellow color, 3 means up to 50% of the skin with a yellow

color, 4 means from 50% to 70% of the skin with a yellow color and 5 means from 76% to 100% of the skin with a yellow color.

Softening Index (SI) determination

When possible, means comparisons were made every two days with fruits that were randomly chosen from each orchard. Approximately 70,000 fruits sampled in total, from 8 to 10 orchards that were studied over the course of 44 weeks. The firmness measurements were submitted to regression analysis, assuming a linear relationship. Only firmness values equal to or greater than 20 N were used, since values lower than 20 N indicate that the pulp is completely soft, after which the values tend to stabilize. Graphs of pulp firmness were plotted as a function of time (days after harvest), assuming linear behavior. The slope of the regression was designated the Softening Index (SI). The SI was determined weekly in each sampled orchard for each maturation stage.

Statistical analysis

The measurements were arranged in a completely randomized design. The data were analyzed by analysis of variance (ANOVA). Statistical analyses were carried out using the SAS software (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

Results

‘Soft’ and ‘hard’ fruits

After the 12-day storage period at 10°C, the fruits had firmness values ranging from 60 to 153 N. Fruits that had an SI ranging from -9.08 to 0.79 were considered to be ‘hard’. Some fruit became soft during the storage period, achieving the appropriate firmness for consumption (≤ 20 N) before the end of the storage period (between eight and ten days). In some cases, SI was strongly negative, around -36.60. Fruits with an SI below -10 were considered to be ‘soft’, with firmness ranging from 15 to 69 N at the end of the storage period.

Figure 1 illustrates the difference in the softening of fruits from a single orchard. SI ranged from -2.62 in the seventh week ('hard' fruit) to -19.79 in the ninth week ('soft' fruit). During those weeks, all the orchards showed similar patterns as to the firmness of the fruits; in the seventh week, all the orchards had 'hard' fruits, and in the ninth week, all the orchards had 'soft' fruits.

Occurrence of Early Softening disorder

The occurrence of the disorder throughout the year is shown in Figure 2. Each point represents an average SI value across the eight papaya orchards that were surveyed. During some periods of the year, SI values were less negative (i.e., the fruits remained firm throughout the 12-day storage period at 10°C). During other periods of the year, SI values were more negative, indicating that the fruits were soft at the end of the storage period. From February to May 2005, SI values were predominantly low (i.e., the fruit pulp softened considerably). This time period corresponds to the end of summer and autumn, and papaya producers report that this is the period when the fruits are more prone to pulp softening. However, pulp softening may occur at other times as well. Orchards in which fruits show Early Softening disorder may yield normal fruits after a few weeks; the contrary is also true. In winter and spring, 'hard' fruit was predominant, except for some weeks in November and December 2004. It is possible that the beginning of the rainy season may have stimulated this behavior. The occurrence of this disorder may also be related to nutritional unbalance, which is then aggravated by the occurrence of intense rain. In some weeks, some orchards yielded 'soft' fruits while others yielded 'hard' fruits, resulting in high standard deviation values.

The average values of firmness obtained from the 8 orchards over the 44-week time span show that both 'soft' fruits and 'hard' fruits lost firmness during storage (Table 1) but that the 'soft' fruits were subject to more intense softening. The 'soft' fruits and the 'hard' fruits showed similar pulp firmness during harvest and could be distinguished only during storage. The 'soft'

fruits could be distinguished from the ‘hard’ ones after the fourth day of storage at 10°C (Table 1).

Characterization of Early Softening Disorder

Fruits with Early Softening cannot be distinguished from normal fruits by skin color analysis or by pulp firmness at the time of harvest. The loss of firmness in both ‘soft’ and ‘hard’ fruits occurred in a similar way in the two maturation stages that were surveyed (Table 1). Maturation stage at harvest does not affect the occurrence of the disorder, since fruits harvested at stage 1 and fruits harvested at stage 2 lost firmness in the same manner. The Early Softening disorder occurred in both maturation stages.

One of the difficulties in identifying the presence of Early Softening disorder in green fruit is that, at harvest time, the fruit shows skin color and pulp firmness characteristic of fruit in the ripe stage, independently of being ‘soft’ or ‘hard’. There was no significant difference in skin color between ‘soft’ and ‘hard’ fruits of either stage 1 or stage 2 at the time of harvest (day 0) (Table 2).

The ‘soft’ and ‘hard’ fruits were statistically distinguishable from each other by the second day of storage at 10°C. Practically, it would be impossible to differentiate the two types of fruits due to the small difference between them (0.18 to 0.25 in the range of color grades) and due to the high variability of the fruits within each lot. Each value in Table 2 represents an average of at least 150 lots or 1,500 fruits. The yellowing of the skin occurs less rapidly than the softening, resulting in fruits that are still partially green when the pulp is ready for consumption. Only after the sixth day of storage is it possible to observe a change in skin color in the ‘soft’ fruits, but the firmness of these fruits decreases significantly after the fourth day (Tables 1 and 2).

Discussion

Variation in firmness is not desirable for commercialization of any fruit, because it can cause considerable post-harvest losses if the fruit is ready for consumption before it arrives at the

point of sale. The 'Golden' papaya is exported to markets in North America and Europe in refrigerated containers. The average time for the arrival of a papaya in the US by cargo ship is approximately 20 days.

We still do not know the causes for the Early Softening disorder, and the problem has not been previously reported in the literature. We believe that this disorder may be related to nutritional factors, especially those that are dependent on the climate. We know very little about the behavior of enzymes in the degradation of the papaya cell wall and how these enzymes are altered in fruits with Early Softening disorder. When there is a decrease in firmness, the enzymes that are involved in the breakdown of the cell wall may play a role, especially those that are dependent on ethylene, such as polygalacturonase, pectin methylesterase and galactosidase (Ali et al., 2004). The cohesion between the components of the cell wall is an important factor in determining the firmness of the fruit. The dissolution of the middle lamellae, which is rich in pectin, and the modification of the primary cell wall contribute to the softening of fruit (Crookes & Grierson, 1983). The hormone ethylene is related to the maturation and senescence processes of seasonal fruits. At a certain stage of maturation, ethylene is linked to its receptor in the cell, creating an enzymatic protein complex and starting a series of events that culminates with the maturation and senescence of the fruit (Lelièvre et al., 1997). According to Giovannoni (2001), ethylene is necessary to coordinate and complete maturation in climacteric fruits. The visual aspect of the skin is the first characteristic observed during the maturation phase; changes in color indicate the degradation of chlorophyll due to changes in pH, increases in acids, an increase in the oxidation process, the action of chlorophyllase and the synthesis of carotene pigments and anthocyanin, which make the fruit yellow after harvesting (Seymour et al., 1993). In papayas with the Early Softening disorder, the change in skin color does not follow the decrease in firmness. It is possible that skin yellowing may be less dependent than the loss of firmness on ethylene.

1-methylcyclopropene (1-MCP) has an important role in fruit ripening. In addition to restricting the action of ethylene, it may reduce the production of ethylene and delay ripening of

several climacteric fruits, such as avocado (Fan et al., 2000) and apple (Argenta et al., 2001). Jacomino et al. (2002) have reported a reduction in respiratory activity and ethylene production and a loss of firmness in papaya that have been treated with 1-MCP. Fabi et al. (2007) have reported that papaya treated with 1-methylcyclopropene had undesirable and irreversible pulp hardness. Preliminary results indicate that 'soft' fruits barely respond to treatment with 1-MCP at dosage levels used for normal fruit, especially when trying to maintain pulp firmness. Different applications of 1-MCP in fruits with similar rates of firmness and skin color were compared, and variations that might influence the effectiveness of the ethylene were controlled. There seem to be physiological differences between 'hard' and 'soft' fruits that may be related to the rate of ethylene production, the sensitivity of the tissue to ethylene action, the availability of ethylene biosynthesis precursors or the activation of enzymes involved in cell wall metabolism.

Conclusion

1. The Early Softening disorder of 'Golden' papaya is characterized by loss of firmness in less than ten days, even when stored under refrigeration. Although softened, the skin color of the fruit remains partially green.
2. 'Soft' fruits occur more frequently from mid-summer to mid-autumn.
3. It is not possible to distinguish fruits with the Early Softening disorder from normal fruits by skin color analysis and pulp firmness at the time of harvest.
4. The 'Softening Index' methodology allows 'soft' fruits to be distinguished from 'hard' fruits when the fruits are stored at 10°C for 12 days.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Rohm and Haas Quimica Ltda and Caliman Agrícola S.A. companies and the Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz.

References

- CHEN, C. C.; PAULL, R. E. Sugar metabolism and pineapple flesh translucency. **Journal of American Society and Horticultural Science**, v. 125, p.558-562, 2000.
- CROOKES, P. R.; GRIERSON, D. Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isozymes in cell wall degradation. **Plant Physiology**, v.72, p.1088-1093, 1983.
- FABI, J. P.; CORDENUNSI, B. R.; BARRETO, G. P. de M.; MERCADANTE, A. Z.; LAJOLO, F. M.; NASCIMENTO, J. R. O. do. Papaya fruit ripening: response to ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6118-6123, 2007.
- FAN, X.; ARGENTA, L.; MATTHEIS, J.P. Inhibition of ethylene action by 1-methylcyclopropene prolongs storage life of apricots. **Postharvest Biology and Technology**, v.20, p.135-142, 2000.
- FAO. Food and agriculture organization of the united nations. Disponível em: <http://www.fao.org/corp/statistics/en/>. Acesso em 12 de agosto de 2006.
- GIOVANNONI, J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. **Annual review of plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p.725-749, 2001.
- IBRAF. Instituto Brasileiro de Frutas. **Comparativo das Exportações Brasileiras de Frutas Frescas**. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/estatisticas/exportacao.asp>. Acesso em 19 de dezembro de 2007.
- ISHII, M.; HOLTZMANN, O.V. Papaya mosaic disease in Hawaii. **Plant Disease Report**, v.47, p.947-951, 1963.
- JACOMINO, A. P.; KLUGE, R. A. BRACKMAN, A.; CAMARGO e CASTRO de, P. R. Amadurecimento e senescência de mamão com 1-metilciclopropeno. **Scientia Agricola**, v.59, n.2, p.303-308, 2002.
- LELIÈVRE, J. M.; LATCHE, A.; JONES, B.; BOUZAYEN, M.; PECH J. C. Ethylene and fruit ripening. **Physiology Plantarum**, v. 101, p.727-739, 1997.

- MARTINS, D.; COSTA, A. de F. S. da. **A cultura do mamoeiro**: tecnologias de produção. Vitória: Incaper, 2003. 497 p.
- OLIVEIRA, J. G.; CAMPOSTRINI, E.; BRESSAN-SMITH, R.; CUNHA, M.da ; TORRES NETTO, A; COSTA, E. S.; COUTINHO, K.S.; GOMES, M. M. de A; PEREIRA, M. G. Gelificação da polpa de frutos de mamão (*Carica papaya* L.) da variedade 'Golden': caracterização de uma anomalia.. In: **XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura**, 2002, Belém, PA. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2002. v. 17. p. 1-5.
- REYES, E. M. Q.; PAULL, R. E. Skin freckles on solo papaya fruit. *Scientia Horticulturae*, v. 58, p. 31-39, 1994.
- SOUZA, S. A. M. Mamão No Brasil: distribuição regional da produção e comportamento dos preços no período 1996-2005. **Informações Econômicas**, SP, v.37, n.9, 2007.
- SEYMOUR GB, TAYLOR JE, TUCKER GA. **Biochemistry of Fruit Ripening**. London: Chapman & Hall, 1993.
- TUCKER, G. A. Introduction. In:SEYMOUR, G.B.; TAYLOR, J.E.; TUCKER, G. A. **Biochemistry of Fruit Ripening**. London: Chapman & Hall, 1993. cap.1, p. 53p.

Figure 1- Regression lines show the rates of loss of firmness in 'Golden' papaya harvested from a single orchard in the seventh and ninth weeks of 2005.

Figure 2- Softening index of 'Golden' papaya fruits during a 44-week time span, from September 2004 to July 2005 (Mean $\pm$ S.D., n=1.120).

Table 1. Pulp firmness of ‘Golden’ papaya fruits of two maturation stages at harvest, stored for 12 days at 10°C.

		days at 10°C.....						
		0	2	4	6	8	10	12
Stage 1	Hard	116.7 Aa	114.6 Aa	117.3 Aa	110.0 Ba	101.7 BCa	97.5 Ca	91.1 Ca
	Soft	112.4 Aa	111.0 Aa	90.8 Bb	62.3 Cb	53.2 CDb	48.1 Db	42.2 Db
Stage 2	Hard	112.9 Aa	115.7 Aa	108.6 Ba	95.7 ABa	85.7 Ca	85.1 Ca	83.7 Ca
	Soft	117.0 Aa	106.6 Aa	85.7 Bb	53.0 Cb	43.9 CDb	42.9 CDb	38.0 Db

Means followed by the same small letters within columns and by the same capital letters within rows are not significantly different at $P = 0.05$ using the Tukey Multiple Range Test.

Table 2. Skin color of ‘soft’ and ‘hard’ ‘Golden’ papaya fruits of two maturation stages at harvest, stored for 12 days at 10°C.

		days at 10°C.....						
		0	2	4	6	8	10	12
Stage 1	Hard	1.00 Aa	1.15 Ab	1.16 Ab	1.28 ABb	1.48 Bb	1.92 Cb	2.01 Cb
	Soft	1.04 Aa	1.33 Aa	1.39 Aa	1.96 Ba	2.16 BCa	2.35 CDa	2.74 Da
Stage 2	Hard	1.93 Aa	1.98 Ab	2.17 ABa	2.23 ABb	2.48 BCb	2.62 Cb	2.65 Cb
	Soft	2.00 Aa	2.23 Aa	2.31 ABa	2.62 Ba	3.05 Ca	3.09 Ca	3.32 Ca

Means followed by the same small letters within columns and by the same capital letters within rows are not significantly different at $P = 0.05$ using the Tukey Multiple Range Test. Values refer to a range of color grades, where 1 = up to 15% of the skin with a yellow color, 2 = up to 25% of the skin with a yellow color, 3 = up to 50% of the skin with a yellow color, 4 = from 50% to 75% of the skin with a yellow color and 5 = from 76% to 100% of the skin with a yellow color.

ANEXO B – Exemplo da firmeza da polpa (N) em frutos sem e com o distúrbio do amolecimento precoce (DAP). Setas em vermelho demonstram o valor obtido da firmeza da polpa avaliada no 4º dia de armazenamento a 10°C

ANEXO C - Dados pluviométricos obtidos na estação experimental da empresa Caliman Agrícola de maio de 2007 a setembro de 2009. As setas representam as semanas em que foram realizadas as coletas

ANEXO D - Dados de temperatura média obtidos na estação experimental da empresa Caliman Agrícola de maio de 2007 a setembro de 2009.