UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

**PERFIL DE CARBOIDRATOS DE DIFERENTES
CULTIVARES DE MANGA DURANTE O
DESENVOLVIMENTO E AMADURECIMENTO**

Ana Paula Fioravante Bernardes Silva

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof. Dr. **BEATRIZ ROSANA CORDENUNSI**

São Paulo
2000

ANA PAULA FIORAVANTE BERNARDES SILVA

**PERFIL DE CARBOIDRATOS DE DIFERENTES CULTIVARES DE MANGA
DURANTE O DESENVOLVIMENTO E AMADURECIMENTO.**

**COMISSÃO JULGADORA
DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE**

PRESIDENTE E ORIENTADORA

PROF.DRA.BEATRIZ ROSANA CORDENUNSI

1º EXAMINADOR

PROF. TITULAR. FRANCO MARIA LAJOLO

2º EXAMINADOR

PROF. DR. ROGÉRIO LOPES VIEITES

São Paulo, 12 de setembro de 2000.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, eu gostaria de agradecer a DEUS pelo Dom da vida, e por sempre me mostrar o caminho certo a seguir.

Aos meus pais, Sônia e Odilon, pela vida, pelo amor, pela minha formação. Aos meus irmãos, Fábio e Marcelo. Aos meus tios, tias, primos e primas, por tudo. Aos meus avós, Teresa, Eleonora, Oswaldo e Armando (*in memoriam*), Ao meu sogro Hélio, pelos aconselhamentos sempre tão sábios, que muito me foram importante, e por todo amor. A Idê, Paulo Henrique e Denise, por sempre estarem tão próximos.

Ao Professor Rogério L. Vieites, que me apresentou à Ciência dos Alimentos, e me deu a oportunidade de ingressar na área de pesquisa.

Ao Sr. José Rezende por atenciosamente me ceder as mangas indispensáveis para a realização deste trabalho.

À amiga Priscila, que desde o início, ainda no estágio, sempre me deu muito carinho, atenção, paciência e força.

À amiga Maria Luíza, que as coincidências da vida, nos tornaram tão próximas, obrigado por tudo que me fez, tudo que me ensinou, orientou, não só no laboratório, mas na vida.

Aos colegas de trabalho: Marisa, Inés, Patricia, Renata, Rosecler, Jacqueline, Tânia, Stella, Lúcia, Selene, Telma, Eduardo, Anderson, Alberto, Adair e Guilherme.

A minha amiga Márcia, minha Segunda mãe, tão dedicada e amorosa, quanto seu carinho me é importante.

Ao Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento, pela amizade, dedicação em ensinar.

Ao Prof. Tit. Franco M. Lajolo, pelos conselhos e ajuda sempre que necessária.

Aos funcionários Isabel, Mônica e Ângela, da Secretária do Departamento, Jorge, Elaine e Benê, da Secretária da Pós-Graduação, a Joana e Lurdinha, pela ajuda, carinho e atenção.

Aos demais Professores e colegas do Laboratório e do Departamento, pelo carinho e ajuda.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Principalmente, pois sem eles eu não teria conseguido finalizar este trabalho.

À Professora Beatriz R. Cordenunsi, que foi mais do que uma orientadora, foi uma verdadeira "mãe", acreditando desde o início na minha vontade e determinação, abrindo todas as portas e principalmente, dando a mão e seguindo junto durante todo o processo, à ela o meu muito obrigado.

Ao meu marido Carlos Felipe, que eu precisaria de mais um mestrado para explicar tanta compreensão, tanta paciência, tanta dedicação durante todo esse período. À você eu terei muito tempo para agradecer e recompensar, nós temos uma vida juntos, graças à Deus.

Ao meu filho Felipe, que hoje ainda, não entende a sua importância na minha vida, mais um dia saberá que é a razão dela, obrigado filho por tudo que me proporcionou como pessoa.

À TODOS MUITO OBRIGADO!

“Não é digno de se deliciar do mel, aquele que se afasta da colméia por medo das abelhas”.

Willian Shakespeare

Dedico este trabalho

**Aos meus pais, Sônia e Odilon,
e aos amores da minha vida Carlos e Felipe**

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO:	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 . FRUTOS	2
2.2. BIOQUÍMICA DO AMADURECIMENTO DOS FRUTOS.....	4
2.2.1. COR	4
2.2.2. TEXTURA.....	4
2.2.3. SABOR	5
2.2.4. MANGA.....	7
2.2.4.1. <i>Adoçamento da manga</i>	9
2.2.5. METABOLISMO DA SACAROSE.....	11
3. OBJETIVOS:.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. MATERIAL	15
4.2. MÉTODOS	15
4.2.1. AÇÚCARES SOLÚVEIS.....	15
4.2.2. AMIDO	16
4.2.3. EXTRAÇÃO DA SACAROSE-FOSFATO SINTASE E SACAROSE SINTASE	16
4.2.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SACAROSE-FOSFATO SINTASE E SACAROSE SINTASE.	16
4.2.5. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL PARA WESTERN BLOTTING...	17
4.2.6. ELETROFORESE E WESTERN BLOTTING	17
4.2.7. ANÁLISE DE TEOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO DURANTE O AMADURECIMENTO DA MANGA.	18
4.2.8. MEDIDAS DE CO ₂ E ETILENO	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1. Carboidratos.....	19

5.1.1 - AMIDO: SÍNTESE E DEGRADAÇÃO	19
5.1.2 SACAROSE.....	22
5.1.3. HEXOSES E AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS	28
5.2. Atividade da sacarose-fosfato sintase e sacarose sintase durante o amadurecimento da manga Van Dyke	29
5.2.1. OTIMIZAÇÃO DO MEIO EXTRATOR E DESSALINIZAÇÃO	29
5.2.2 ATIVIDADE DA SS E SPS DURANTE O CRESCIMENTO E AMADURECIMENTO DA MANGA VAN DYKE	31
5.3. Teores de ácido ascórbico durante o desenvolvimento e amadurecimento da manga.....	35
5.4. Perfil de respiração e etileno	38
6. CONCLUSÕES	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
8. RESUMO	51
9. ABSTRACT	52

Lista de Figuras

Figura 1: Teores de amido e sacarose em diversas variedades de mangas durante a formação do fruto e amadurecimento.....	21
Figura 2: Perfis cromatográficos (HPLC-PAD) de açúcares solúveis durante o desenvolvimento e amadurecimento de mangas da variedade Van Dyke.....	24
Figura 3: Teores de açúcares solúveis, glicose, frutose e sacarose em mangas, durante a formação e o amadurecimento das var. Haden e Tommy Atkins.....	25
Figura 4: Teores de açúcares solúveis, glicose, frutose e sacarose em mangas, durante a formação e o amadurecimento das var. Van Dyke e Palmer.....	26
Figura 5: Teores de açúcares solúveis, glicose, frutose e sacarose em manga, durante a formação e o amadurecimento da var. Keitt	27
Figura 6: Atividade das enzimas SS e SPS (μmol sacarose. g/h) e teores de sacarose (%) durante o desenvolvimento e amadurecimento de mangas da var. Van Dyke.....	33
Figura 7: Western-blotting revelado com antisoro anti-SPS de banana durante o desenvolvimento e amadurecimento de mangas da var. Van Dyke.....	34
Figura 8: Western-blotting revelado com antisoro anti-SS de banana durante o desenvolvimento e amadurecimento de mangas da var. Van Dyke	34

Figura 9: teores de ácido ascórbico (mg/100g) durante o desenvolvimento e amadurecimento de mangas das var. Keitt, Palmer, Haden, Tommy Atkins e Van Dyke.....37

Figura 10: Perfil de respiração e produção de etileno em mangas das var. Tommy Atkins, Van Dyke e Haden após a colheita.....39

Lista de Tabelas

Tabela 1: Teores de carboidratos em cinco variedades de manga madura.....28

Tabela 2: Atividade da sacarose-fosfato sintase e sacarose sintase durante o desenvolvimento e amadurecimento da manga Tommy utilizando meio extrator 1.....30

Tabela 3: Atividade da sacarose-fosfato sintase e sacarose sintase durante o desenvolvimento e amadurecimento da manga Van Dyke utilizando meio extrator 2.....30

PERFIL DE CARBOIDRATOS DE DIFERENTES CULTIVARES DE MANGA DURANTE O DESENVOLVIMENTO E AMADURECIMENTO

1. INTRODUÇÃO:

Os frutos são parte importante da dieta humana, tanto na forma fresca como processada, estando em constante aumento de demanda, pela qualidade e extensa variedade existente. Comercialmente, o ramo é dominado por um número relativamente pequeno de frutos, entre eles a uva, a banana, as frutas cítricas, a maçã, o pêssego e o tomate. Isto decorre, em parte, porque são frutos de fisiologia e bioquímica pós-colheita relativamente bem conhecidas, o que resulta em metodologias eficientes pós-colheita para controle da senescência e perdas. Porém, consumidores ocidentais estão começando a se interessar mais por outros frutos, que denominam de “exóticos” e o mercado para este tipo de fruto está aumentando rapidamente.

A manga ainda é considerada um fruto exótico pelos consumidores de países não produtores, mas é o segundo fruto mais importante, depois da banana, em termos de produção e área cultivada. O seu comércio e transporte a longa distância no entanto, é dificultado em virtude da sua alta perecibilidade, que é altamente suscetível a doenças pós-colheita, extremos de temperatura e injúria física. Assim, a maior parte da tecnologia pós-colheita para a manga foi desenvolvida no sentido de desinfestar o fruto e de desenvolver embalagens que evitem a injúria mecânica.

Apesar de ser fruto climáterico, não está estabelecido ainda quando é que o climatério normalmente acontece, antes da colheita ou depois. Alguns trabalhos mostram que o fruto já possui altos níveis de etileno endógeno ainda ligado à árvore e várias mudanças ligadas ao amadurecimento acontecem antes mesmo da maturação fisiológica (Cua *et al*, 1990). Outra característica é que a manga parece não responder à aplicação de etileno exógeno, o que não corresponde às características de frutos climátericos, e isto dificulta os processos de uniformização dos frutos quanto à maturação (Seymour, 1993). Em parte porque se conhece muito pouco da fisiologia e bioquímica do amadurecimento da manga, e do metabolismo pós-colheita, em processos

importantes para a qualidade, como as mudanças relativas a textura e adoçamento (Seymour, 1993; Frylink *et al*, 1987; Khader, 1991).

Este trabalho tem por objetivo verificar que os perfis dos açúcares solúveis relativos ao adoçamento e seu metabolismo são altamente dependentes do cultivar e da maturidade fisiológica da manga. Este fato estendido a outros fatores característicos do amadurecimento, faz supor que será muito difícil obter uma só metodologia de conservação para todas as variedades de mangas e que a individualidade relativa ao cultivar deve se estender a uma individualização de tratamento pós-colheita. Mostrar também que os teores de amido existentes quando a manga é colhida, independente da variedade, são muito baixos, e que as enzimas ligadas ao metabolismo da sacarose tem a atividade aumentada na fase de amadurecimento pós-colheita no cultivar Van Dyke.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 . FRUTOS

Os frutos são constituídos principalmente de água e carboidratos. O conteúdo de água da parte comestível pode chegar a 93% como no caso da melancia mas, em geral, situa-se em torno de 85% como nas frutas cítricas, com pequenas variações. Por causa da alta porcentagem de água e, em alguns casos, das altas taxas de respiração, os frutos apresentam maior atividade metabólica que outros vegetais, acarretando maior perecibilidade, gerando assim grandes perdas comerciais.

Alguns frutos como a banana madura (em torno de 72% de água), possuem altas quantidades de açúcares solúveis, que podem atingir até 20% em algumas variedades e até 10% em carboidratos de reserva e estruturais, o que pode refletir em quantidades significativas de fibra alimentar (Mota *et al*, 1997). Em geral, exceto no caso da azeitona e abacate em termos de lipídeos, frutos não são fontes significativas de proteínas e lipídeos, mas podem ser fontes importantes de carotenóides (pró-vitamina A), vitamina C e alguns minerais, como o cálcio e o potássio (Tucker, 1993).

São três os estádios que caracterizam os frutos: o desenvolvimento, o amadurecimento e a senescência. Muitas vezes, como no caso dos frutos que amadurecem na árvore, não existem uma definição muito clara entre crescimento e amadurecimento, podendo o fruto apresentar sinais claros de que está amadurecimento e ter ainda, expansão celular em pequena escala. Já nos frutos que acumulam material de reserva e amadurecem fora da árvore, esta distinção é bastante clara. É possível colher o fruto verde porém é necessário que esteja fisiologicamente maduro, para que tenha condição de amadurecer normalmente. Como o amadurecimento pode ser entendido como o início do final da vida de um fruto a nível celular, ou o começo da senescência, é importante que o momento certo da colheita seja muito bem estabelecido, porque disto irá depender a qualidade e a vida de prateleira do fruto (Chitarra e Chitarra, 1990).

Um exemplo deste tipo de fruto é a manga que, se for colhida no máximo grau de sua maturidade, não poderá ser estocada por muito tempo em boas condições, porém se colhida ainda imatura, provavelmente não irá amadurecer, e poderá perder seu flavour e aroma caracterizado por um delicado balanço de ácidos e açúcares, que será enfraquecido com uma colheita prematura (Cua e Lizada, 1990; Tucker, 1993). Essa característica é devido ao padrão climatérico de respiração da manga. Frutos com esse padrão respiratório apresentam aumento rápido e significativo da respiração imediatamente antes, ou durante o amadurecimento e aumento na produção autocatalítica do etileno (Awad, 1993).

Este aumento de respiração nos frutos é devido à demanda de energia e de carbono, que são gastos nos processos de síntese de novas proteínas, de mRNAs, etc., característicos do amadurecimento. Embora todos os frutos respirem, eles diferem nas taxas respiratórias e nos padrões de mudanças de respiração. Os frutos que possuem, durante o amadurecimento, aumento das taxas respiratórias, são chamados de climatéricos. O que os difere dos chamados não climatéricos é que, após a colheita, eles não tem produção autocatalítica de etileno e tem as taxas de respiração diminuídas. Outra característica dos frutos não climatéricos é não responder ao etileno exógeno. Frutos não climatéricos típicos são o melão, o abacaxi, o morango e as frutas

cítricas, enquanto que os climatéricos são a banana, o mamão, a uva e a goiaba (Biale e Young, 1981).

2.2. BIOQUÍMICA DO AMADURECIMENTO DOS FRUTOS

2.2.1. COR

Durante o amadurecimento dos frutos, a transformação mais óbvia e frequente é a mudança da cor, sendo o critério mais importante utilizado pelo consumidor para julgar sua maturidade. A mudança mais comum consiste do desaparecimento da cor verde, seguido do aparecimento de cores que variam de amarelo ao vermelho. Exceções importantes são os frutos de clima tropical como o abacate e a laranja. Estas mudanças são luz-dependentes e envolvem pigmentos como clorofila, carotenóides e antocianinas. As clorofilas se encontram nos cloroplastos, associados a carotenóides, que são precursores da vitamina A. As antocianinas são glicosídeos de certos compostos fenólicos, geralmente encontrados nos vacúolos das células. Durante o amadurecimento, ocorre síntese de pigmentos associada à degradação da clorofila, que encobre alguns pigmentos preexistentes, sendo que estes passam a ser notados (Awad, 1993; Paull, 1996). A clorofila decresce nos cloroplastos, enquanto que os pigmentos carotenóides e antocianinas se desenvolvem (Chitarra e Chitarra, 1990).

Outras mudanças importantes em relação ao amadurecimento dos frutos são as de textura e de sabor, principalmente pelo decréscimo de ácidos e pela síntese e acúmulo de açúcares solúveis.

2.2.2. TEXTURA

A maioria dos frutos amolece durante o amadurecimento e este é um dos atributos de qualidade, que muitas vezes dita a vida de prateleira de um fruto (Tucker, 1993). Este amolecimento pode ser resultado de três

mecanismos: perda de turgidez, degradação de amido ou degradação da parede celular do fruto.

A perda de turgidez ocorre em função da perda de água que pode ser equivalente a 5-10% do peso fresco do fruto. Embora isso não tenha consequências sérias em termos fisiológicos, em geral diminui sua aceitação comercial (Tucker, 1993).

A degradação do amido resulta em uma pronunciada mudança de textura, especialmente em frutos onde a porcentagem de amido é alta, como a banana e o kiwi (MacRae *et al.*, 1992).

Mas, dentre estes mecanismos, o mais importante é a degradação da parede celular, sendo a laméla média, rica em polissacarídeos, a estrutura mais afetada durante o amadurecimento (Huber, 1983; Tucker, 1993). A parede celular é composta por 2 camadas distintas, sendo uma formada por microfibrilas compostas por celulose e, outra microcristalina formada por pectinas, hemiceluloses e compostos fenólicos (Brett & Waldrón, 1990). A hidrólise das pectinas, das hemiceluloses e da celulose da lamela média e da parede celular, por várias enzimas, provoca o amolecimento da maioria dos frutos (Awad, 1993). As enzimas que parecem estar relacionadas com estas transformações são as galactosidases, as pectinametilesterases, as poligalacturonases e as celulasas (Huber, 1983).

2.2.3. SABOR

O sabor do fruto é uma sensação complexa que envolve substâncias voláteis relativas ao aroma, substâncias fenólicas, açúcares solúveis e ácidos orgânicos. Outros fatores que influenciam essa sensação são a aparência, o comportamento durante a manipulação, a sensação na boca e os sons produzidos durante a mastigação (Awad, 1993).

Açúcares e ácidos orgânicos são substratos usados na respiração. Em geral, a concentração de ácidos orgânicos diminui durante a maturação do fruto, por ser usado como fonte de energia durante a respiração e até como fonte de carbono para a síntese de açúcares. Na banana e no abacaxi, são encontrados os níveis mais altos de ácidos orgânicos durante a maturação. Os

ácidos mais encontrados em frutos são o málico e o cítrico. Tanto os açúcares como os ácidos orgânicos são assimilados fotossinteticamente, dependendo dessa assimilação a manutenção de toda a planta (Awad, 1993; Davies & Robinson, 1996).

Uma das mudanças quantitativas mais importantes durante a maturação dos frutos é a hidrólise do amido, e sua conversão em açúcares que contribuem para o sabor doce. Os principais açúcares solúveis encontrados em frutos são a glicose, a frutose e sacarose. A banana (Arêas & Lajolo, 1981), o kiwi (MacRae, *et al.*, 1992) e a maçã (Inaba, 1993; Treptow *et al.*, 1995, citados por Bierhals, 1998), são exemplos importantes de frutos que acumulam altas quantidades de amido durante a fase de crescimento. A banana acumula cerca de 20% de amido, que é degradado durante o amadurecimento, com concomitante acúmulo de açúcares solúveis (cerca de 16%), com predominância da sacarose (Arêas & Lajolo, 1981). O kiwi acumula cerca de 15% de amido, que é degradado durante o amadurecimento para cerca de 9% de açúcares com predomínio das hexoses (MacRae *et al.*, 1992). Esta é uma característica dos frutos climatéricos que possibilita que eles sejam colhidos ainda verdes e tenham uma vida pós-colheita mais longa que os frutos não climatéricos.

Os frutos não climatéricos, em geral, não tem reserva de amido para ser degradado na pós-colheita e devem, necessariamente, acumular açúcares solúveis originados pela fotossíntese, ainda na planta. Compreende-se assim porque o fruto deve ser colhido pronto para o consumo, uma vez que o processo de adoçamento não se desenvolve após a colheita, a não ser em proporções muito pequenas, resultante da degradação da parede celular (Akazawa e Okamoto, 1980). Frutos como a laranja, o melão, a melancia e a uva se encaixam nesta categoria. São frutos que adoçam muito pouco após a colheita, provavelmente em função da degradação da parede celular ou do metabolismo dos ácidos orgânicos (Peynaud & Ribéreau-Gayon, 1971; Ting & Attaway, 1971).

Existe ainda uma categoria de frutos, muito pouco estudados, que acumulam baixas quantidades de amido, são climatéricos, mas grande parte do acúmulo de açúcares solúveis responsáveis pelo adoçamento parecem ser acumulados antes da colheita. O mamão, por exemplo, ao ser colhido no pré-

climatério, está praticamente com todo o seu conteúdo final de açúcares solúveis. Durante o amadurecimento existe síntese de sacarose, em pequena proporção, mas desconhece-se a fonte de carbono, para esta síntese (Gomez *et al.*, 1999). A manga é um exemplo de fruto onde quase tudo relativo ao seu amadurecimento está por ser esclarecido.

2.2.4. MANGA

A manga (*Mangifera indica* Linn.) é uma dicotiledonea da família Anacardiaceae, que se desenvolve principalmente nos países tropicais (Subramanyam *et al.*, 1975; Tjiptono *et al.*, 1984). Existem dois cultivares distintos, um originário da Índia e outro das Filipinas e sudoeste da Ásia. O cultivar Indiana é pouco tolerante a umidade, possui uma coloração vermelho intenso e um forte aroma. São monoembrionários e se reproduzem assexuadamente, sendo ainda mais suscetíveis ao ataque de fungos. Os cultivares Filipinos, são mais resistente a umidade, tem uma coloração verde pálido ou vermelho vivo ,são poliembrionários e mais resistentes ao ataque de fungos (Kusumo *et al.*, 1984). As sementes perdem rapidamente a viabilidade, sendo que a melhor forma de reprodução do fruto é através da propagação vegetativa.

É o fruto mais importante, depois da banana, em termos de produção mundial e de área cultivada mas, estudos ainda estão sendo feitos no sentido de identificar índices de maturidade do fruto, fundamentais para a colheita, com a finalidade de aumentar a vida pós-colheita sem comprometer a qualidade. Em geral, a maior parte da produção é consumida "*in natura*" na localidade de produção. A exportação é ainda muito baixa, mas está crescendo em importância comercial e é uma possibilidade valiosa de fonte de renda para países produtores. Porém o comércio internacional deste fruto está quase sempre limitado por causa de sua característica perecível, e de problemas fitossanitários, acarretando muitas vezes grandes perdas de mercado (Medlicott & Thompson, 1985).

Os frutos tem uma grande variação em relação a cor, formato, tamanho e sabor. A cor varia de verde ao vermelho, em relação ao momento do

desenvolvimento e ao cultivar. Seu formato varia de oval para oblíquo e, seu peso pode variar de alguns gramas até kilogramas, por exemplo, frutos da variedade Van Dyke chegam a pesar 350 g e, das variedades Keitt e Tommy Atkins cerca de 800 g logo após a colheita (Hulme, 1971).

Um dos principais problemas pós-colheita da manga, além das doenças, é a perda de firmeza, que aumenta a suscetibilidade a injúrias e a deterioração, comprometendo o seu armazenamento e transporte (Mitcham & MacDonald, 1992). A maior parte das tecnologias desenvolvidas, visa o controle de doenças e proteção contra injúrias durante o acondicionamento e transporte, uma vez que se sabe que, o amadurecimento não pode ser atrasado o suficiente para permitir o transporte a longas distâncias (Lizada, 1993; Medlicot & Thompson, 1985). Tecnologias no sentido de aumentar a vida pós-colheita do fruto, como atmosfera modificada ou controlada, irradiação e aplicação de hormônios como o ácido giberélico não tem dado resultados satisfatórios (Frylink *et al*, 1987; Khader, 1991; Seymour, 1993).

Outra característica que também poderia ser responsabilizada pela pouca qualidade pós-colheita da manga seria seu padrão respiratório. A manga parece possuir um padrão respiratório típico do fruto climatérico, ou seja, possui um pico respiratório quando o fruto atinge o ponto de firmeza da polpa, em termos de textura, porém esta taxa respiratória alta se mantém no estágio pós-colheita, fazendo com que todos os processos metabólicos que ocorrem durante o amadurecimento sejam acelerados, levando este fruto a perdas de características desejáveis ao consumo bem mais rápido (Mitcham & MacDonald, 1992). Porém, Cua e Lizada, (1990), apresentaram resultados realizados com mangas da variedade “Carabao”, que não apresentaram um típico padrão climatérico de respiração, ou seja, o pico climatérico ocorreu 10 dias antes do fruto estar maturo para a colheita, apresentando um amolecimento e amarelecimento da polpa antes do ponto de colheita. Estes autores mostraram que a produção de etileno e algumas mudanças associadas com o amadurecimento ocorrem na manga “Carabao” antes da colheita.

A textura é o mais importante fator de qualidade da manga, e isto está diretamente relacionado com o tempo de prateleira, suscetibilidade à injúrias e o desejo do consumidor (Tucker & Seymour, 1991). O amadurecimento da manga é caracterizado pelo amolecimento da polpa. As mudanças texturais

que ocorrem durante o amadurecimento do fruto são relatados como sendo alterações na estrutura da parede celular, relacionadas com componentes pécticos (Huber, 1983; Tucker & Grierson, 1987). Já que o amolecimento é acompanhado pela solubilização da pectina, durante o amadurecimento de mangas (Abu-Sarra, 1992), de pêssegos (Shewfelt, 1965; Shewfeld *et al*, 1971), pêras (McCready & McComb, 1954) e maçãs (Bartley, 1976), envolvendo a ação das enzimas pectinasterase (PE) e a poligalacturonase (PG) (Abu-Sarra, 1992). A PG tem sido detectada em pêssegos maduros (Pressey *et al.*, 1971) e pêras (McCready e McComb, 1954) mas não em frutos imaturos. Durante o amadurecimento há uma queda abrupta da firmeza do fruto, e este declínio coincide com o ponto máximo climatérico, o mesmo foi observado para bananas e pêras (Abu-Sarra, 1992).

As diferenças entre as variedades de manga tem apresentado diferentes graus de amolecimento durante o armazenamento, e podem ser agrupados como sendo boas ou ruins para estocagem. Isto pode ser por diferenças na síntese de etileno ou por diferentes respostas ao etileno exógeno (Tucker & Seymour, 1991).

2.2.4.1. Adoçamento da manga

Apesar da importância comercial dos níveis de açúcares, o estudo e a compreensão do metabolismo dos carboidratos nesta fruta é limitado, sendo que esta informação é essencial em termos do desenvolvimento racional de uma tecnologia pós colheita.

Os frutos imaturos, são adstringentes, ricos em ácidos e vitamina C (ácido ascórbico). Os valores de ácido ascórbico variam entre 250mg/100g no fruto verde, 90mg/100g na fase intermediária do amadurecimento e 165mg/100g no fruto maduro de mangas da variedade Alfonso (Mattoo e Modi, 1969). Soule e Hatton (1955), citados por Hulme (1971), encontraram 79mg/100g no fruto verde e 25mg/100g em mangas da variedade Haden maduras. Os ácidos málico e cítrico parecem predominar no fruto verde declinando durante o amadurecimento. Também foram encontrados ácido tartárico, ascórbico, oxálico e α -cetoglutárico em baixas concentrações. Os

taninos da polpa têm contribuição importante para o sabor (Medlicott & Thompson, 1985; Awad, 1993).

Porém, com a maturidade, a acidez e o conteúdo de vitamina C decaem, e há um aumento dos teores de açúcares solúveis, tornando os frutos doces (Lakshminarayana *et al.*, 1970; Pandey *et al.*, 1974; Medlicott & Thompson, 1985). As vias metabólicas que levam ao adoçamento da manga são ainda desconhecidas e os poucos dados que existem na literatura são bastante controversos. Alguns autores correlacionam a síntese da sacarose, açúcar predominante na manga, à degradação do amido acumulado durante a fase de crescimento do fruto (Fuchs *et al.*, 1980; Tandon e Kalra, 1983).

O amido foi descrito como sendo o principal carboidrato na manga verde por Subramanyam *et al.* (1975) e Mattoo *et al.* (1975), sendo acumulado cerca de 1 a 13% no desenvolvimento, hidrolisado durante o amadurecimento do fruto, e responsabilizado pelo conteúdo final de sacarose. Segundo Fuchs *et al.*, 1980 e Tandon *et al.*, 1983 a atividade das amilases na manga aumenta com o desenvolvimento do fruto, paralelamente com o aumento do seu peso. Em frutos verdes depois de colhidos e armazenados a 20°C, o conteúdo de amido começa a decair gradativamente, seguido por um substancial aumento de atividade das amilases. Em frutos maduros, quando são detectados apenas traços de amido, a atividade das amilases é bem reduzida. Por outro lado, Hubbard *et al.* (1991) e Castrillo *et al.* (1992), demonstram que o nível total de amido na manga, é insuficiente para fornecer mais do que 7% do carbono necessário para a produção da sacarose.

Os dados são conflitantes também no que diz respeito aos níveis dos açúcares solúveis durante o amadurecimento do fruto. Krishnamurty & Subramanyam (1973), afirmam que as hexoses são os açúcares predominantes no início do amadurecimento da manga (3 a 4%) e que a sacarose só predomina no fruto maduro (12%). Os mesmos resultados foram apresentados por Awad (1993), onde a sacarose foi o açúcar mais importante do fruto (cerca de 10% do peso fresco), acompanhada de menores quantidades de açúcares redutores (por volta de 6%). Em contraste, Medlicott & Thompson (1985), relatam que a sacarose foi o açúcar predominante durante todo o amadurecimento do cultivar "Keitt", contribuindo em cerca de 57% do conteúdo total de açúcares no fruto maduro e a frutose e a glicose com cerca

de 28% e 15% respectivamente. Outros autores ainda descrevem que podem ocorrer tanto um aumento dos teores de açúcares durante o crescimento, quanto estes açúcares permanecerem constantes durante todo o desenvolvimento da fruta (Krishnamurthy *et al*, 1960; Salunke, *et al.*, 1973; Hubbard *et al*, 1991, citados por Castrillo, *et al*, 1992).

2.2.5. METABOLISMO DA SACAROSE

A sacarose é o açúcar solúvel predominante na maioria dos frutos maduros, sendo a principal forma pela qual o carbono é translocado e, usualmente, o primeiro produto da fotossíntese. Este transporte pode ser via apoplasto ou via simplasto. E estudos envolvendo raízes de ervilha, milho e cevada, determinaram que os procedimentos de transporte via simplasto não requerem a hidrólise prévia de sacarose em hexoses. No entanto, em cana-de-açúcar, o transporte via apoplasto é extremamente dependente da hidrólise intracelular (Rees, 1988).

Os níveis de sacarose em vegetais superiores são regulados por três enzimas: a sacarose-fosfato sintase (SPS), a sacarose sintase (SS) e as invertases (Leloir & Cardini, 1955).

A sacarose-fosfato sintase (SPS) (EC 2.4.1.14), é considerada a enzima chave na síntese da sacarose. Utiliza como substratos a uridina difosfo-glicose (UDPG) e a frutose-6-fosfato (F-6P), produzindo a sacarose-6-fosfato e a uridina-difosfato (UDP). Esta reação é praticamente irreversível pelo fato da sacarose-6P produzida ser convertida imediatamente em sacarose por ação sacarose-fosfato fosfatase (SPP) (Hawker, 1985). Ela provavelmente existe na forma de um dímero ou tetrâmero, com subunidades de peso molecular variando entre 116 e 138 kD. Sua atividade é regulada por ativação/inativação de metabólitos, ou por sítio alostérico, por meio de fosforilação reversível (Salermo & Pontis, 1977; Hawker, 1985) ou por aumento na sua expressão (Nascimento *et al*, 1997).

A partir de alguns resultados obtidos com vegetais, em tomates (Miron *et al*, 1991; Dali *et al.*, 1992); milho (Worrel *et al*, 1991); em pêras japonesas (Moriguchi *et al*, 1992); mangas (Castrillo *et al*, 1992); espinafre (Klein *et al*,

1993); batata doce (Hesse *et al*, 1995); banana (Nascimento, 1997) e Kiwi (Langenkamper *et al*, 1998), pode-se afirmar que há uma forte correlação entre o acúmulo de sacarose e a atividade da SPS.

A sacarose sintase (SS) (EC 2.4.1.13), cataliza a reação reversível: $\text{NDPG} + \text{frutose} \leftrightarrow \text{sacarose} + \text{NDP}$. Onde N pode ser, uridina, timidina, adenina, etc. Esta reação possui uma constante de equilíbrio variando de 1 a 8 dependendo da temperatura e pH (Wolosiuk & Pontis, 1971). Mesmo possuindo uma constante de equilíbrio favorável à síntese de sacarose, a SS parece estar relacionada à síntese de amido. Neste caso a ADPG parece ser o substrato preferido.

Na banana, foi observado que a SS tem alta atividade durante o desenvolvimento do fruto, fase de acúmulo de amido (Cordenunsi, 1989; Cordenunsi e Lajolo, 1995; Nascimento *et al*, 1997). Durante o amadurecimento, depois da colheita, há uma queda brusca na atividade da SS, tornando-se indetectável, no fruto maduro (Geigenberger & Stitt, 1993; Bendazzoli, 1995). O mesmo comportamento foi observado no arroz (Chan *et al*, 1990), em batatas (Pressey, 1970; Geigenberger & Stitt, 1993; Murata, 1972), em melões (Lingle & Dunlap, 1987) e pêssegos (Vizzotto *et al*, 1992).

As invertases (EC 3.2.1.26), podem ser neutras ou ácidas dependendo do seu pH ótimo, que pode variar de 7,5 a 5,0 respectivamente (Hawker, 1985). As invertases hidrolisam a sacarose produzindo glicose e frutose de uma maneira irreversível, devido a perdas de energia das ligações glicosídicas (Moriguchi *et al*, 1991). As invertases neutras predominam no citoplasma, em tecidos fisiologicamente maduros. Já as invertases ácidas encontram-se nos vacúolos e, tem maior atividade em tecidos em crescimento, que estão em rápido desenvolvimento celular. As hexoses produzidas podem tanto ser armazenadas, quanto translocadas para tecidos onde sejam prontamente utilizados, já que são substratos necessários para a respiração e síntese de parede celular (Dey & Dixon, 1985). Estudos feitos em mamão, demonstraram que a atividade das invertases aumentou consideravelmente durante o amadurecimento do fruto, sendo a atividade da invertase ácida maior do que a neutra (Gomez, 1998). Castrillo *et al* (1992) verificaram, na manga variedade Haden, a atividade da SPS foi maior no mesmo período de maior acúmulo de sacarose, sendo suficiente para ser responsabilizada pelo teor máximo de

sacarose produzida durante o amadurecimento. A SS participaria como fornecedora de substratos indispensáveis para a síntese de sacarose durante o amadurecimento da manga, apresentando teores constantes durante o mesmo período. Estes concluíram ainda que as invertases, provavelmente não contribuem significativamente para o metabolismo da sacarose durante o amadurecimento da manga. Em manga existe muito pouca literatura relatando o comportamento dessas duas enzimas a SPS e a SS, sua extração e determinação é bastante complicada, e os dados apresentados pela literatura existente não se reproduzem.

Logo pode-se verificar que, os dados relativos ao adoçamento da manga, existentes na literatura atual, são escassos, conflitantes e não conclusivos. Além disso, a maior parte destes estudos não especifica a variedade da manga estudada e nem seu estágio de maturação, o que não permite que se compare os poucos resultados que existem na literatura.

3. OBJETIVOS:

Este trabalho teve como objetivos específicos:

1. Avaliar qualitativamente e quantitativamente 05 variedades de manga durante o crescimento e amadurecimento; quanto aos açúcares solúveis, amido e ácido ascórbico.
2. Avaliar a atividade das enzimas sacarose-fosfato sintase e sacarose sintase durante o amadurecimento da variedade Van Dyke;
3. Avaliar o perfil de respiração e etileno das variedades Van Dyke, Tommy Atkins e Haden após a colheita.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Mangas das variedades Haden, Tommy Atkins, Van Dyke, Keitt e Palmer foram obtidas de um produtor local, em duas fases: (1) durante a maturação fisiológica, com 90, 120 e em alguns casos com 160 dias pós antese (dpa) e (2) durante o amadurecimento. Para os testes relativos ao amadurecimento a variedade Palmer foi colhida com cerca de 180 dpa, a variedade Keitt com cerca de 205 dpa e as variedades Haden, Tommy Atkins e Van Dyke com cerca de 160 dpa. Estas, foram armazenadas em câmara tipo B. O .D, com temperatura (20 °C) e umidade (90%) controladas e amostradas durante o amadurecimento. As amostras da fase 1 (no mínimo três frutos) e da fase 2 (no mínimo dois frutos), foram descascadas, picadas e congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a - 80°C até a análise. Todas as amostras foram pulverizadas com o auxílio de nitrogênio líquido antes da sua utilização.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. AÇÚCARES SOLÚVEIS

Os açúcares solúveis foram extraídos homogeneizando-se cerca de 0,2g da amostra em 1 ml de etanol 80% a 80°C. O homogenato foi mantido sob agitação mecânica a 80°C por 20 minutos e centrifugado a 17.000 xg por 30 minutos. A extração foi repetida três vezes, os sobrenadantes foram juntados e o volume acertado com etanol para 5 ml. O etanol de uma alíquota de 1 ml foi evaporado a vácuo a 43 °C (em sistema de speed vac), e o resíduo retomado em água, foi utilizado para as determinações de glicose, frutose e sacarose (Arêas e Lajolo, 1981). As análises foram feitas em HPLC (Dionex) acoplado a detector de pulso amperométrico, utilizando coluna CarboPac PA1 (Dionex), em corrida isocrática com fluxo de 1mL/min de NaOH (18mM).

4.2.2. AMIDO

As análises de amido foram feitas no resíduo proveniente da extração dos açúcares solúveis (método 4.2.1), pelo método otimizado por Arêas e Lajolo (1980), onde o amido foi solubilizado com hidróxido de sódio, precipitado com etanol e hidrolisado com amiloglicosidase. A glicose resultante foi quantificada pelo sistema glicose-oxidase-peroxidase/ABTS (Bergmeyer, 1974).

4.2.3. EXTRAÇÃO DA SACAROSE-FOSFATO SINTASE E SACAROSE SINTASE

Cerca de 1 g de amostra, foi homogeneizada em 5 ml de solução extratora em Potter Elvehjem, por 1 minuto. O homogenato foi centrifugado por 10 minutos a 4300 xg e o sobrenadante concentrado por ultrafiltração em Centriprep-30 (AMICON) a 1075 xg. O extrato concentrado foi dialisado através de coluna Sephadex G-25 HiTrap Desalting (Pharmacia) e o eluído dividido em 5 frascos de 1 ml . A fração com maior quantidade de proteína medida pelo método de Bradford (1976), e menor quantidade de açúcares solúveis determinada através do método do Fenol sulfúrico (Dubois *et al*, 1956), foi utilizada para medir a atividade das enzimas.

A solução extratora era composta de tampão Hepes-NaOH (50 mM) pH 7,4, contendo EDTA (1 mM) pH 7,0; MgCl₂ (5mM) ; albumina soro bovina (BSA) (0,5 mg . ml⁻¹); glicerol [2% (v/v)]; Triton X-100 [0,05% (v/v)] e dithiothreitol (2,5 mM), segundo Castrillo *et al* (1992).

4.2.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SACAROSE-FOSFATO SINTASE E SACAROSE SINTASE.

A atividade da SPS foi determinada em meio saturante constituído de 60 µl de Hepes-KOH pH 7,5 (50 mM) contendo frutose-6P (5mM), glicose-6P (15 mM), UDPG (10 mM), MgCl₂ (15 mM) e 40 µl do extrato enzimático dialisado,

num total de 100 μ l, incubados a 37°C. Após 20 minutos interrompeu-se a reação com 200 μ l NaOH 1,0N, e a frutose remanescente foi destruída em água fervente (10 min.). A sacarose formada foi determinada pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA) (Percheron, 1962). A atividade da SS foi determinada da mesma maneira, porém o meio de atividade foi constituído de Tris-HCl (100 mM) pH 7,5; frutose (10 mM); UDPG (5 mM) e MgCl₂ (15 mM).

4.2.5. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL PARA WESTERN BLOTTING

Cerca de 1 g de amostra foi homogeneizada em 5 ml de solução extratora constituída de tampão Tris-HCl 0,25 M (pH 8,4), contendo glicina 0,2 M, SDS [0,4% (p/v)] e β -Mercaptoetanol [10% (v/v)]. O homogenato foi centrifugado a 12.000 xg por 20 min., e o precipitado descartado. A proteína do sobrenadante foi precipitada com TCA 12% em gelo por pelo menos 2 h. Após centrifugação a 12.000 xg por 20 min., desprezou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado inicialmente com solução gelada de etanol-éter etílico-clorofórmio (2:2:1) e submetido a nova centrifugação. Este procedimento foi repetido, utilizando-se sequencialmente acetona e éter etílico. Após a evaporação do éter, o resíduo foi ressuspensionado em menor volume possível de tampão Laemmli (1970). A proteína resultante foi quantificada pelo método de Lowry et al, (1951), modificado por Peterson (1977), utilizando BSA como padrão.

4.2.6. ELETROFORESE E WESTERN BLOTTING

As eletroforeses foram feitas em géis de poliacrilamida (7,5%), sob condições dissociantes, em tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM (pH 8,3) contendo SDS 0,1%, segundo Laemmli (1970). Os géis foram feitos em duplicatas, sendo as bandas de proteína de um dos géis reveladas com solução de Comassie Blue-R e, o outro gel utilizado para o Western blotting, foi

pressionado sobre membrana de nitrocelulose em tampão 25 mM Tris; 192 mM glicina (pH 8,3). A voltagem foi fixada em 30 volts e a transferência foi conduzida por toda noite a 4°C. A membrana foi corada para proteína com Ponceau-S 0,2% / 3% TCA e, dividida em duas, sendo uma usada para SS e outra para SPS. As membranas foram bloqueadas por incubação por 1 hora em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), contendo 150 mM NaCl e leite desnatado a 5%. Posteriormente, foi adicionado o anti-soro de coelho contra SPS (Nascimento,1997) e SS (Bendazzoli *et al*,1995), ambos na diluição 1:500, onde foram mantidas por 24 horas em agitação a temperatura ambiente. Após lavagem em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), contendo 150 mM NaCl, as membranas foram incubadas por 2 horas com anticorpo de cabra anti-coelho, conjugado com fosfatase alcalina, em tampão contendo leite desnatado 5%. Após nova lavagem, a revelação das bandas foi feita em tampão para fosfatase alcalina contendo Tris-HCl (pH 9,5); NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM; 150 µg/mL de NBT (azul de p-nitro-tetrazolio) e 75 µg/mL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato). A reação foi interrompida por água Milli-Q e, as membranas foram secas à temperatura ambiente.

4.2.7. ANÁLISE DE TEOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO DURANTE O AMADURECIMENTO DA MANGA.

O ácido ascórbico total foi extraído homogeneizando-se cerca de 0,5 g de amostra em 5 ml de solução de ácido metafosfórico a 0,3%. As amostras foram então centrifugadas a 32.571 xg/20 min., a determinação do teor de ácido ascórbico foi realizado a partir da otimização do método de Picón *et al.*, (1993), onde o sobrenadante após filtragem (0,45 µm -MILIPORE), foi injetado em HPLC acoplado com detector de arranjo de diodos (DAD) a 254 nm. A coluna utilizada foi uma ZORBAX SB-C8, 3.5 µ, 3.0 mmx15 cm, com NaHCO₃ 0,2M de fase móvel, num fluxo de 0,5 mL/min .

4.2.8. MEDIDAS DE CO₂ E ETILENO

Foram analisadas três variedades, obtidas especialmente para este fim: a Van Dyke, a Haden e a Tommy Atkins. Três frutos, de cada variedade, no ponto comercial de colheita, foram mantidos em câmara do tipo B.O.D com temperatura (20°C) e umidade (cerca de 90%) controladas. Todos os dias até a senescência, os frutos foram encerrados individualmente em frascos hermeticamente fechados por aproximadamente 1 hora. As análises de CO₂ e etileno foram feitas, coletando-se uma amostra do gás encerrado no frasco, obtido com seringas de 1mL para CO₂ e 10 mL para etileno.

O CO₂ e o etileno, foram medidos através de cromatografia gasosa (HP 6890), onde o etileno foi detectado por ionização de chama (FID) e o CO₂ por detector térmico (TCD). Em ambos os casos foi utilizada uma coluna HP-PLOT com 30 m de comprimento e 0,53 mm de diâmetro interno. A injeção dos gases foi realizada manualmente com seringa GAS Tigth, própria para injeção de gases. Foi utilizado o hélio como o gás de arraste, no volume de 1 mL/min para etileno e 4 mL/min para CO₂.

Para as análises de CO₂ as condições de trabalho foram: temperatura isotérmica (forno) de 30°C; temperatura do injetor e do detector de 250°C; fluxo de 4 mL/min; modo de injeção split, com taxa de split de 50:1 e volume de injeção de 1mL.

Para as análises de etileno as condições de trabalho foram as seguintes: temperatura isotérmica (forno) de 30 °C; temperatura do injetor de 20°C, detector de 250°C; fluxo de 1mL/min; modo de injeção pulsed split, com uma taxa de split de 12,5:1 e um volume de injeção de 10 mL.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARBOIDRATOS

5.1.1 - AMIDO: SÍNTESE E DEGRADAÇÃO

Pode-se observar na figura1 que os teores de amido acumulado não

ultrapassaram 3% na manga verde e que não houve uma uniformidade no acúmulo e na degradação do amido, em relação às variedades analisadas, tanto em termos de quantidade, quanto em termos de fases de acúmulo e degradação. Duas variedades se destacaram: a variedade Tommy teve cerca de 1,6% de amido acumulado durante a fase de formação do fruto, que se manteve durante todo o período de amadurecimento sem degradação aparente; a variedade Keitt, acumulou cerca de 2,5% de amido antes da colheita, que foi completamente degradado durante o amadurecimento, mas o processo só começou à partir do 5º dia pós colheita. Comportamento diverso das variedades Van Dyke, Haden, Palmer e Keitt que acumularam respectivamente 1%, 1%, 2% e 2,5% de amido, que foi completamente degradado na fase de amadurecimento, chegando à níveis quase indetectáveis na manga madura, iniciando-se esta degradação bem antes da colheita.

Figura 1: Teores de amido(--●--) e sacarose(--■--) em diversas variedades de manga, durante a formação do fruto e o amadurecimento. ➡ significa ponto de colheita.

5.1.2 SACAROSE

A análise dos açúcares solúveis, por HPLC (figura 2), mostrou que os principais açúcares acumulados durante o amadurecimento da manga, foram a glicose, a frutose e a sacarose, não sendo detectados outros açúcares solúveis. Durante o período de formação até a colheita do fruto, a frutose foi o açúcar o predominante, em todas as variedades estudadas (figuras 3,4 e 5), exceto na Van Dyke, onde a sacarose predominou desde o início. Depois da colheita até o completo amadurecimento, a sacarose predominou em todas as variedades, exceto a Tommy (figura 3), que continuou tendo a frutose como açúcar predominante até o completo amadurecimento.

A síntese da sacarose, não parece estar estreitamente correlacionada, quantitativamente, com a degradação do amido na manga. De maneira geral, a quantidade de amido degradado não foi suficiente para justificar a quantidade de sacarose acumulada, e na Tommy nem houve degradação de amido. A exceção foi a Keitt, onde parece haver uma correlação estreita entre degradação de amido e a síntese de sacarose, estes resultados estão também quantitativamente em concordância com os dados obtidos por Castrillo *et al* (1992), que trabalharam com mangas var. Haden, colhidas antes do amadurecimento. Os resultados deles mostraram que a maior parte da sacarose foi acumulada após a colheita, em detrimento das baixas quantidades de amido existentes. O que contrapõe os resultados de Subramanyam *et al* (1975) e Morga *et al* (1979), citados por Castrillo *et al* (1992), que creditam ao amido, segundo eles acumulado em altas quantidades, o carbono utilizado como fonte para a síntese da sacarose na pós colheita.

Ainda na figura 3,4 e 5, pode-se ver que a sacarose começou a ser acumulada, de maneira significativa, muito antes da colheita, em todas as variedades. E, de novo, temos aqui os mais diversos comportamentos, em relação às variedades. Enquanto na Tommy a maior parte da sacarose, 75% foi acumulada depois da colheita, apesar de não haver perceptível degradação de amido, na Keitt houve um acúmulo de 54%, na Van Dyke de 22%, na Haden de 27% e na Palmer um decréscimo de 37% em relação ao total de sacarose acumulada.

Os teores de sacarose na manga madura (tabela 1), variaram de 1,2%

na var. Tommy a 4,2% na Van Dyke. A Haden teve 2,6% de sacarose no fruto maduro, resultado muito diferente do encontrado por Castrillo *et al*, (1992), que encontrou nesta variedade cerca de 10%. Mas a metodologia utilizada para a quantificação da sacarose deixa margem a dúvidas quanto a adequação da extração dos açúcares e quanto à especificidade do método.

Em todas as variedades percebe-se que a colheita foi um evento importante, no amadurecimento do fruto. Sabe-se que na banana, a atividade de algumas enzimas e a produção da sacarose, são diferentes em frutos que amadureceram ligados à planta-mãe e em frutos colhidos (Cordenunsi e Lajolo, 1995), o que sugere a ação de hormônios veiculados da planta para o fruto, como o ácido indolacético (AIA) ou as giberelinas. A infiltração de AIA em fatias de banana pré-climatéricas atrasou a expressão das β -amilases, a degradação do amido e a síntese da sacarose (Purgatto, *et al* 1999). Pode ser que aqui esteja acontecendo alguma semelhante que merece ser investigada.

Figura 2. Perfis cromatográficos (HPLC-PAD) de açúcares solúveis durante o desenvolvimento e amadurecimento de mangas da variedade Van Dyke.

Figura 3. Teores de açúcares solúveis, glicose (-■-), frutose (-●-) e sacarose (--▲--) em mangas das var. Haden e Tommy Atkins, durante a formação e o amadurecimento. → significa ponto de colheita.

Figura 4. Teores de açúcares solúveis, glicose (-■-), frutose (-●-) e sacarose (--▲--) em mangas das var. Van Dyke e Palmer, durante a formação e o amadurecimento.
 ➔ significa ponto de colheita.

Figura 5: Teores de açúcares solúveis, glicose (-■-), frutose (-●-) e sacarose (--▲--) em mangas da var. Keitt, durante a formação e o amadurecimento (A) e, após o ponto de colheita (B). ➡ significa ponto de colheita.

Tabela 1: Teores de carboidratos em 5 variedades de manga madura. O resultado representa a média de 3 extrações e determinações.

variedade	Amido %	Glicose %	Frutose %	Frut./glic.	Sacarose %	Açúcares solúveis totais
Van Dyke	0,01±0,01	0,04 ±0,00	1,94±0,08	48	4,24±0,32	6,22
Haden	0,04±0,00	0,05±0,00	1,46±0,01	29	2,63±0,00	4,14
Tommy	0,80±0,44	0,66±0,00	1,63±0,01	2,5	1,24±0,03	3,24
Keitt	0,00±0,00	0,29±0,00	2,94±0,03	10	3,32±0,02	6,55
Palmer	0,32±0,06	0,37±0,00	2,24±0,03	6	3,44±0,00	6,05

5.1.3. HEXOSES E AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS

A frutose foi a hexose predominante na manga madura, em todas as variedades estudadas. A relação frutose/glicose (tabela 1) variou de 2,5 a 48 vezes, confirmando os resultados apresentados por Castrillo *et al*, (1992), Hubbard *et al* (1991) e Krishnamurthy & Subramanyam (1973). Este é um resultado interessante, uma vez que esta relação costuma ser de um para um na maior parte dos frutos, como a banana (Mota *et al*, 1997), a uva (Davies & Robinson, 1996) e o mamão (Gomez *et al*, 1999).

A soma dos açúcares solúveis (tabela 1), mostra que a variedade Tommy Atkins foi a que menos acumulou açúcares, cerca de 3,5%, seguida pela variedade Haden com cerca de 4%. Já as variedades, Van Dyke, Palmer e Keitt acumularam mais, cerca de 6,5%, um resultado baixo se compararmos com outros frutos, como a banana que acumula por volta de 9 a 20% dependendo da variedade (Mota *et al*, 1997) ou ainda, o mamão com cerca de 11% (Gomez *et al*, 1999).

5.2. ATIVIDADE DA SACAROSE-FOSFATO SINTASE E SACAROSE SINTASE DURANTE O AMADURECIMENTO DA MANGA VAN DYKE

5.2.1. OTIMIZAÇÃO DO MEIO EXTRATOR E DESSALINIZAÇÃO

O meio extrator utilizado à princípio foi o mesmo otimizado por Gomez (1998) para o mamão e para a manga, com algumas modificações . Foi utilizado o tampão tris-HCl (500mM) pH 7,5, contendo EDTA (20mM), cisteína (20mM), PVP-40 (1%) e NaCl (1M) (meio 1). Observe-se que foi necessário o uso do tampão com molaridade mais alta que a habitualmente utilizada nestes casos, porque os extratos de manga são extremamente ácidos. Também não foi possível detectar atividade das enzimas sem o uso de NaCl, apesar de não serem enzimas ligadas à parede celular. Os resultados obtidos com este meio mostraram que, apesar de ser possível detectar atividade da SS e SPS, os valores obtidos foram baixos (tabela 3), parecidos com os obtidos para as enzimas do mamão (Gomez *et al*, 1999). Como havia na literatura resultados com a variedade Haden, mais altos resolvemos testar o meio extrator utilizado por Castrillo *et al* (1992). Neste meio, o tampão utilizado foi o Hepes-NaOH (50mM) pH 7,4, contendo EDTA (1mM), MgCl₂ (5mM), BSA (0,5mg/ml), glicerol [2% (v/v)], Triton X-100 [0,05% (v/v)], PVP-40 (2%) e ditioneitol (2,5mM) (meio 2). Os resultados de atividade da SPS não são totalmente comparáveis, porque nos testes com o meio 1, foi utilizada a manga Tommy (tabela 2) e nos testes com o meio 2, foi utilizada a manga Van Dyke (tabela 3). Mas, pode-se ver que os resultados com o meio 2 resultaram em atividades mais altas, tanto da SS quanto da SPS. O meio 2 foi ainda modificado ao retirar ao PVP, quando testes mostraram que as atividades das enzimas extraídas com o meio extrator 2 com e sem PVP, não tiveram diferenças significativas. Porém, ao ser utilizado este meio extrator para a variedade Keitt, não conseguimos detectar atividade tanto da SS quanto da SPS. Deduzimos assim, que cada variedade de manga vai demandar a otimização de um meio extrator particular. Assim, nos testes subsequentes de atividade da manga Van Dyke foi utilizado o meio extrator 2 sem PVP (tabela 2). O meio de reação para determinação de atividade de SS e

SPS para mangas foi o mesmo utilizado para banana, segundo Cordenunsi (1989).

Tabela 2. Atividade da sacarose-fosfato sintase e sacarose sintase durante o desenvolvimento e amadurecimento da manga Tommy, utilizando o meio extrator 1. A colheita das mangas para os testes de amadurecimento foi feita aos 170 d.p.a.

Dias pós antese	SPS	SS
	$\mu\text{mol sac/g/h}$	$\mu\text{mol sac/g/h}$
110	$1,34 \pm 0.65$	$4,48 \pm 0.07$
140	$1,24 \pm 0.99$	$2,39 \pm 2.07$
170	$1,18 \pm 0.44$	$4,71 \pm 2.11$
171	$2,98 \pm 0.79$	$2,54 \pm 0.50$
174	$3,54 \pm 0.68$	$4,19 \pm 0.17$
179	$4,97 \pm 0.24$	$2,49 \pm 0.40$
180	$1,33 \pm 0.74$	$1,39 \pm 0.28$
181	$1,64 \pm 0.36$	$1,43 \pm 0.14$

Tabela 3. Atividade da sacarose-fosfato sintase e sacarose sintase durante o desenvolvimento e amadurecimento da manga Van Dyke, utilizando o meio extrator 2. A colheita das mangas para os testes de amadurecimento foi feita aos 160 d.p.a.

Dias pós antese	SPS	SS
	$\mu\text{mol sac/g/h}$	$\mu\text{mol sac/g/h}$
90	1.89 ± 0.2	$8.82 \pm$
120	6.14 ± 1.2	4.52 ± 0.4
160	35.78 ± 3.1	7.41 ± 0.7
167	28.83 ± 5.2	$8.05 \pm$

A metodologia de dessalinização também teve que ser otimizada, já que não foi possível diminuir a concentração de açúcares solúveis no extrato enzimático por diálise. Essa diminuição foi necessária porque além dos brancos de reação ficarem muito altos o que diminui a sensibilidade do método

de determinação de atividade, a SS e a SPS são inibidas pela sacarose.

Melhores resultados, que os obtidos por diálise, foram observados quando se utilizou a dessalinização por mini-colunas de Sephadex G-25 (Hitrap Desalting Pharmacia). Com estas colunas verificou-se algumas vantagens como maior rapidez entre a extração e a determinação de atividade, diminuindo assim as chances da ação de proteases. Outra vantagem foi uma melhor separação entre as proteínas e os açúcares, do que a diálise. Porém este processo apresentou dois problemas: (1) nos estádios mais avançados de amadurecimento da manga, o processo não foi muito eficiente na separação dos açúcares e (2) nos estádios que a enzima tinha pouca atividade, o extrato ficava muito diluído após a filtração em gel (cerca de 4 vezes), inviabilizando algumas vezes a detecção da atividade. Assim, uma nova etapa foi acrescentada à esta metodologia onde o extrato era antes dialisado e concentrado cerca de 2 vezes com centriprep-30, e depois dialisado novamente através de peneira molecular (Hitrap Desalting Pharmacia). Este método apresentou os melhores resultados, e foi o adotado para as análises posteriores.

5.2.2 ATIVIDADE DA SS E SPS DURANTE O CRESCIMENTO E AMADURECIMENTO DA MANGA VAN DYKE

A figura 6 mostra os dados relativos à atividade da SPS e SS em mangas da variedade Van Dyke durante o crescimento (90 dpa a 120 dpa) e amadurecimento (160 dpa a 170 dpa). Pode-se observar que a SS depois de uma queda inicial de atividade, teve aumento de atividade de cerca de 4 vezes, paralelo ao aumento do teor de sacarose de cerca de 6 vezes. Este resultado é o contrário do que se observa na banana (Cordenunsi e Lajolo, 1995), onde a SS tem uma diminuição de atividade, que se acelera após a colheita, chegando à níveis próximos de zero na banana madura. A SS do mamão tem um comportamento diferente, já que a atividade permanece praticamente constante durante todo o período de amadurecimento pós-colheita (Gomez *et al*, 1999).

Estes resultados são intrigantes porque, teoricamente, a SS não teria

função durante o amadurecimento do fruto, já que, credita-se à SPS a catálise da síntese da sacarose e não se observa uma hidrólise expressiva da sacarose durante o período analisado. Castrillo *et al* (1992) também observaram uma atividade constante da SS com um ligeiro aumento na fase de máxima síntese da sacarose, durante o amadurecimento da manga Haden.

A SPS apresentou um aumento expressivo de atividade de cerca de 65 vezes (de 0,2 a 36 U) durante o crescimento da manga (figura 6). Após a colheita, a atividade caiu para cerca de 29 U no fruto completamente maduro. Como só foi analisado um ponto depois da colheita não se sabe se esta queda ocorreu logo após a colheita ou, como aconteceu com a banana (Cordenunsi e Lajolo, 1995), nos últimos dias do amadurecimento.

De qualquer maneira, à semelhança do que ocorreu com a banana (Cordenunsi e Lajolo, 1995; Mota *et al*, 1997) e o Kiwi (Langenkamper *et al*, 1998) parece haver uma estreita correlação entre a atividade da SPS e a síntese da sacarose na manga Van Dyke, que não se verificou ainda se ocorre nas outras variedades, uma vez que com a metodologia utilizada para extrair e determinar a atividade das enzimas nesta variedade não foi possível medir a atividade das mesmas enzimas em outras variedades. Isto aconteceu provavelmente em função das diferenças na composição química das diferentes variedades de manga.

Figura 6: Atividade das enzimas SS e SPS (μmol sacarose g/h) e teores de sacarose (%) durante o desenvolvimento e amadurecimento de mangas da variedade Van Dyke. ➡ significa ponto de colheita.

Os resultados obtidos por Western Blot (figura 7), contra anticorpos de SPS de banana, mostram um aumento de expressão da SPS aos 160 dpa, mas não temos pontos no intervalo compreendido entre os 120 dpa, onde a atividade da enzima está ainda muito baixa e os 160 dpa, onde observou-se o máximo de atividade da SPS. Já a expressão da SS (figura 8), parece se manter constante durante o período de desenvolvimento e amadurecimento da manga, em contrapartida com a atividade que parece variar bastante durante o mesmo período. O fato de que os anticorpos da SPS e SS de banana terem reagido com a SPS e SS da manga indica que existe uma semelhança na sequência de aminoácidos entre as proteínas SPS e SS dos dois frutos.

Figura 7: Western-blotting revelado com antisoro anti-SPS de banana durante o desenvolvimento e amadurecimento de mangas da variedade Van Dyke.

Figura 8: Western-blotting revelado com antisoro anti-SS (Wellington) de banana durante o desenvolvimento e amadurecimento de mangas da variedade Van Dyke

Em relação ao peso molecular da subunidade SPS e SS encontrados na manga da variedade Van Dyke (figura 7 e 8), estimada por Western - blotting, não houve nenhuma correlação com outros frutos. Na maioria dos frutos estudados, o peso molecular da SPS varia de 120 kD, em espinafre (Salvucci, *et al.*, 1990) e de bananas (Nascimento, 1997) a 138 kD, em milho (Worrel *et al.*, 1991), resultados diferente do encontrado na manga Van Dyke que foi de 90 kD. Já na SS, foram encontradas várias subunidades, com peso molecular bem variado. Neste caso, alguns resultados se correlacionaram com resultados da literatura, onde Hisajima *et al.*, (1981), encontraram SS em milho com peso molecular de 70 kD; Elling *et al.*, (1993), em arroz 92 kD e em bananas 110 kD (Yang, *et al.*, 1980; Elling, *et al.*, 1993), resultados estes que se aproximam dos obtidos em mangas da variedade Van Dyke.

5.3. TEORES DE ÁCIDO ASCÓRBICO DURANTE O DESENVOLVIMENTO E AMADURECIMENTO DA MANGA.

A figura 9 mostra os teores de ácido ascórbico total durante o desenvolvimento e amadurecimento das variedades Van Dyke, Keitt, Palmer, Haden e Tommy.

Em todas as variedades os teores de ácido ascórbico variaram em torno de 20 a 40 mg/100g. A variedade que teve o maior teor, foi a variedade Palmer (figura 9), com cerca de 40 mg/100g no início do desenvolvimento. Nesta variedade, não ocorreu uma queda tão drástica, pois no fruto maduro ainda pode-se encontrar um conteúdo significativo de ácido ascórbico, já nas variedades Keitt e Van Dyke, a diminuição do conteúdo do ácido ascórbico durante o amadurecimento, foi expressiva. Por exemplo a variedade Van Dyke onde o teor se manteve por volta de 19 a 15 mg/100g e, no ponto de colheita caiu para 7 mg/100 g, praticamente a metade do conteúdo inicial. Em compensação a variedade Tommy teve os maiores teores na manga no final do amadurecimento, cerca de 30 mg/100g.

Exceto a Keitt e a Tommy, todas as outras tiveram o conteúdo de vitamina C diminuído antes da colheita, ainda durante o desenvolvimento.

Os dados encontrados na literatura são para frutos colhidos, em amadurecimento, onde observou-se que existe uma expressiva degradação da vitamina C durante o amadurecimento da manga (Lakshminarayana *et al*, 1970; Pandey *et al*, 1974 e Medicott & Thompson, 1985).

Estes são os primeiros resultados mostrando a evolução do ácido ascórbico durante o desenvolvimento da manga. Estes dados mostram que a manga é um fruto pobre em ácido ascórbico, não podendo ser considerado alimento - fonte. Também, à semelhança do que ocorre com os açúcares, aqui observa-se que não existe uma uniformidade no acúmulo e degradação do ácido ascórbico em relação às diferentes variedades de manga.

Figura 9. Teores de ácido ascórbico (mg/100g) durante o desenvolvimento e amadurecimento de mangas das variedades; Keitt, Palmer, Haden, Tommy e Van Dyke.

5.4. PERFIL DE RESPIRAÇÃO E ETILENO

Segundo Cua *et al.*, 1990, a manga da variedade "Carabao" apresentou um perfil de respiração e produção de etileno atípico de frutos climatéricos, uma vez que apresentou 3 picos climatéricos, sendo um deles antes do ponto de colheita, e os demais depois. Estes resultados mostraram que a produção de etileno e algumas mudanças associadas com o amadurecimento podem ocorrer antes da colheita. Isto é bastante interessante e, mostra mais uma vez que quase tudo relacionado ao metabolismo da manga está por ser esclarecido. Nossos resultados foram obtidos com frutos a partir do segundo dia após a colheita, situação que nos privou de confirmar a observação de pico climatérico antes da colheita (Cua, *et al.*, 1990). Porém, observamos as variedades Van Dyke e Haden (figura 10), um pico respiratório logo no quarto dia após a colheita. Já a variedade Tommy Atkins pareceu não apresentar nenhum pico respiratório significativo, ficando a dúvida, se esse pico climatérico poderia ter ocorrido antes do ponto de colheita, outro pico respiratório ocorreu na variedade Tommy ao final do amadurecimento.

Em relação a produção de etileno, essa não parece estar relacionada com o pico climatérico, no caso das variedades analisadas. Houve um pequeno aumento de produção no nono dia após a colheita, mas nada que possamos afirmar estar relacionado com o pico respiratório. Após os dez dias da colheita, ao final do amadurecimento, houve um aumento na produção de etileno nas var. Van Dyke e Haden (figura 10), mas este parece estar relacionado com a senescência do fruto. Na variedade Tommy Atkins, mais uma vez, não houve grandes variações.

Figura 10: Perfil de respiração (■) (mL CO₂/Kg/h) e produção de etileno (*) (μL etileno/KG/h) em mangas após a colheita.

6. CONCLUSÕES

A manga parece acumular pouco amido, cerca de 1,6% durante a fase de formação do fruto. A quantidade de amido degradado na pós - colheita não parece ser suficiente para justificar a quantidade de sacarose acumulada.

Os principais açúcares solúveis acumulados durante o amadurecimento da manga, são glicose, frutose e sacarose. A frutose foi a hexose predominante, em todas as variedades de mangas analisadas. A sacarose foi o principal açúcar encontrado no fruto maduro, é acumulada tanto na fase de formação do fruto, quanto durante o amadurecimento pós-colheita.

A atividade da SS na manga Van Dyke parece aumentar paralelamente com o aumento do teor de sacarose, durante o crescimento e amadurecimento do fruto. A SPS parece ter um aumento expressivo de atividade durante o crescimento da manga, decaindo no estágio mais avançado de amadurecimento.

O acúmulo e a degradação do ácido ascórbico parece variar em relação as diferentes variedades de mangas. Porém, a maioria das variedades estudadas apresentaram uma diminuição do conteúdo de ácido ascórbico antes da colheita, exceto na Keitt e Tommy Atkins.

As mangas Haden e Van Dyke parecem apresentar um padrão respiratório típico de frutos climatéricos, o que não ocorreu com a manga Tommy Atkins. Já em relação a produção de etileno, essa foi baixa nos sete primeiros dias após a colheita, seguido de um aumento de produção de etileno, que mais parece estar relacionado com a senescência do fruto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-SARRA, A. F., ABU-GOUKH, A. A. Changes in pectinesterase, polygalacturonase and cellulase activity during mango fruit ripening. **J. Hortic. Sci.**, London, v.67, n.4, p.561 – 568, 1992.
- AKAZAWA, T. & OKAMOTO, T. Biosynthesis and Metabolism of sucrose. In: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. eds. **The Biochemistry of Plants**, New York: Academic Press, 1980. v.3, p.199-270.
- ARÊAS, J. A .G. & LAJOLO, F.M. Determinação enzimática específica de amido, glicose, frutose e sacarose em bananas pré-climatéricas e climatéricas. **Anais de Farmácia e Química de São Paulo**, São Paulo, v.20, n.1/2, p. 307-318, 1980.
- ARÊAS, J.A .G & LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening I: the phosphorylase and phosphatase behavior in *Musa acuminata* .**J. Food Biochem.**, Westport, v.5, p.19-37, 1981.
- AWAD, MARCEL. **Fisiologia pós-colheita de frutos**. São Paulo: Nobel, 1993. 114p.
- BARTLEY, I.M. Changes in the glucans of ripening apples. **Phytochemistry**, Oxford, v.15, p.625 – 626, 1976.
- BENDAZZOLI, W.S.; NASCIMENTO, J. R. O .; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Purificação parcial da sacarose sintase em banana em diferentes estágios de desenvolvimento. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.14, n.1, p.55-63, 1994.
- BERGMEYER, H. U. ed. **Methods of enzymatic analysis**. 2ed. New York: Academic Press, 1974, v.3, p.1212 – 1215.
- BIALE, J. B., YOUNG, R. E. Respiration and ripening in fruits – Retrospect and prospect. In: FRIEND, J. RHODES, M. J. C. eds. **Recent advances in biochemistry of fruit and vegetables**. London: Academic Press, 1981. V.19, p.1 – 37.

- BIERHALS, J. D. **Frigoconservação de maçãs (*Malus domestica*, Borkh), cvs. Jonagold e Braeburn, em atmosferas refrigeradas convencional e controlada.** Pelotas, 1998. 64p. (Dissertação de mestrado - Univ. Federal de Pelotas).
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein – dye binding. **Anal. Biochem.**, Baltimore, v.72, p.248 – 254, 1976.
- BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls.** London: Unwin Hyman, 1990. p.169-175.
- CASTRILLO, M., KRUGER, N.J., WHATHEY, F.R. Sucrose metabolism in mango fruit during ripening, **Plant Sci.**, Shannon, v.84 n.1, p. 45-51, 1992.
- CHAN, H.Y.; LING, R.H.; TING, I.N.; SUNG, H.Y.; SU, J.C. Sucrose synthetase in rice plants growth-associated changes in tissue specific distributions. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.94, p.1456-1461, 1990.
- CHITARRA, M. I. F & CHITARRA, A. B. **Pós - colheita de frutas e hortaliças: Fisiologia e manuseio.** Lavras: ESAL/ FAEPE, 1990. 320 p.
- CORDENUNSI, B.R. & LAJOLO, F.M. (1995) Starch breakdown during banana ripening Sucrose Synthase and Sucrose Phosphate Synthase. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 43, p. 347-351, 1995.
- CORDENUNSI, B.R. **Síntese da sacarose no amadurecimento da banana. Envolvimento da Sacarose Sintase e Sacarose Fosfato Sintase.** São Paulo, 1989. 87p. (Tese de Doutorado – Fac. de Ciências Farmacêuticas – USP).
- CUA, A. U., LIZADA, M. C.C. Ethylene production in the “Carabao” mango (*Mangifera indica* L.) fruit during maturation and ripening. **Acta Hort.**, Leuven, v.269, p.169 – 179, 1990.

- DALI, N. , MICHAUD, D. , YELLE, S. Evidence for the involvement of sucrose phosphate synthase in the pathway of sugar accumulation in sucrose accumulating tomato fruits. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.99, p.434-438, 1992.
- DAVIES, C.; ROBINSON, S. P. Sugar Accumulation in Grape Berries - Cloning of two Putative Vacuolar Invertases cDNAs and their expression in Grapevine Tissues. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 111, p. 275-283, 1996.
- DEY, P.M.; DIXON, R. A. **Biochemistry of storage carbohydrates in green plants**. London: Academic. Press, 1985. cap.1, p.1-48.
- DOMINGUEZ - PUIGJANER, E.; VENDRELL, M.; LUDEVID, M.D. Differential protein accumulation in banana fruit during ripening. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 98, p. 157-162, 1992.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, Washington, v.28, p.350 – 356, 1956.
- ELLING, L., KULA, M. R. Purification of sucrose synthase from rice and its protein-chemical characterization. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v.29, n.3, p.277 – 286, 1993.
- FRYLINK, L.; DUBERY, I.A ; SHABORT, J.C. Biochemical changes involved in stress response and ripening behaviour of γ -irradiated mango fruit. **Phytochemistry**, Oxford, V.26, p.681-686, 1987.
- FUCKS, Y.; PESIS, E. ; ZAUBERMAN G. Changes in amylase activity, starch and sugar contents in mango fruit pulp. **Scientia Hortic.**, New York, v.13, p.155 - 160, 1980.
- GEIGENBERGER, P. & STTIT, M. Sucrose syntase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. **Planta**, Berlin, v.189, p.329-339, 1993.

- GOMEZ, M. L. A .; LAJOLO, F.M.; CORDENUNSI, B.R- Metabolismo de carboidratos durante o amadurecimento do mamão (Carica papaya L. cv Solo): Influência da radiação gama. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.19, n.2, p. 246-252, 1999.
- GOMEZ, M., L., P., A. **Metabolismo de carboidratos durante o amadurecimento do mamão (Carica papaya L. cv. Solo): Influência da radiação gama.** São Paulo, 1998. 61 p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- HAWKER, J.S. Sucrose. In: DEY, P.M. & DIXON, R.A . **Biochemistry of storage carbohydrates in green plants.** London : Academic Press, 1985. p.53-120.
- HESSE, H., SONNEWALD, U., WILLMITZER, L. Cloning and expression analysis of sucrose-phosphate synthase from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 247, p.515 - 520, 1995.
- HISAJIMA, S. ITO, T. Purification and properties of sucrose synthase from morning-glory callus cells. **Biol. Plant.**, Prague, v.23, n.5, p.356 – 364, 1981.
- HUBBARD, N.L.; PHARR, D.M. Developmental changes in carbohydrate concentration and actives of sucrose metabolizing enzymes in fruits of two *Capsicum annum* L. genotypes. **Plant Sci.**, Shannon, v. 86, n.1, p.33-39, 1992.
- HUBBARD, N.L.; PHARR, D.M.; HUBER,S.C. Roler of sucrose-phosphate synthase in sucrose biosynthesis in ripening bananas and its relationship to the respiratory climateric. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.94, p.201-208, 1990.
- HUBBARD, N.L.; PHARR, D.M.; HUBER,S.C. Sucrose - phosphate Synthase and other sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.82, p.191-196, 1991.
- HUBER, D. J. - The role of cell wall hydrolases in fruit softening. **Horticultural Review.** Flórida, v.5, cap. 4, p.169-219, 1983.

- HULME, A. C. The mango. In: HULME, A. C. **The biochemistry of fruits and their products**. New York: Academic Press, 1971. V.2, p. 233 – 253.
- KHADER, S.E.S.A - Effect of preharvest application of GA₃ on postharvest behaviour of mango fruit. **Scientia Horticulturae**, New York , v.47, p.1109-1114, 1991.
- KLEIN,R.R.; CRAFTS - BRANDER,S.J.; SALVUCCI, M. E. Coning and developmental expression of sucrose -phosphate synthase gene from spinach. **Planta**, Berlin, v.190, p. 498-510, 1993.
- KRISHNAMURTY, S., SUBRAMANYAM, H. Pre- and post-harvest physiology of de mango fruit: a review. **Trop. Sci.**, Oxford,v. 15 , p. 167 - 193, 1973.
- KUSUMO, S.L.; VANGNAI, V.; YONG, S.K.; NAMUCO,L. O .Commercial mango cultivars in ASEAN mango. In: MENDONZA , J. B. JR., WILLS, R. B. H. eds, **ASEAM food J**, Kuala Lumpur., p.12-20, 1984.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, London, v.94, p.201-208, 1970.
- LAKSHMINARAYANA, S.; SUBHADRA, M. V. ; SUBRAMANYAM, H. - Some aspects of developmental physiology of mango fruit. **J. Hort. Sci.**, London, v. 45, p. 133 - 42, 1970.
- LANGENKAMPER, G.; MCHALE, R.; GARDNER,R.C.; MACRAE,E. Sucrose-phosphate synthase steady-state mRNA increase in ripening Kiwi fruit . **Plant Molecular Biology**, New Zealand, v.36, p.857-869, 1998.
- LELOIR, L. F.; CARDINI, C. E. The biosynthesis of sucrose phosphate. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 214, p.157-165, 1955.
- LINGLE, S.E.; DUNLAP, J.R. Sucrose metabolism in Netted Muskemon fruit during development. **Plant Phisiol.**, Bethesda, v.84, p.386-389, 1987.
- LIZADA, C. Mango, In: SEYMOUR,G.; TAYLOR,J and TUCKER,G. eds. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Academic Press, 1993. v.8, p.255 - 271.

- LOWRY, O .H.; ROSENBROUGH,N.J.; RANDHALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.193, p. 265 - 275, 1951.
- MATOO, A. K., MODI, V. V. Biochemical aspects of ripening and chilling injury in mango. **Proceedings of the conference on tropical and subtropical fruits**, London, v.15 – 19, p.111 – 115, 1969.
- MATOO, A.K.;MURATA, T., PANTASTICO, Er. B.; CHACHIN, K.; OGATA, K.; PHAN, C.T. Chemical changes during ripening and senescence. In: PANTASTICO, E.B., ed. **Post- harvest Physiology, Handling and Utilization of Tropical and Subtropical Fruits and Vegetables**. Westport : Avi Pub;Co, 1975. p.103-127.
- McCREADY, R. M., McCOMB, E. R. Pectic constituents in ripe and unripe fruits. **Food Research**, Chicago, v.19, p.530 – 535, 1954.
- McRAE, E.; QUICK, W.P.; BENKER, C.; STITT, M. Carbohydrate metabolism during postharvest ripening in Kiwi fruit. **Planta**, Berlim, v.188, p.314-323, 1992.
- MEDLICOTT, A .P., THOMPSON, A . K. Analysis of sugars and organic acids in ripening mango fruits (*Mangifera indica* L. var Keitt) by high performance liquid chromatography. **J. Sci. Food Agric.**, London,v.36, p.561-566, 1985.
- MIRON, D.; SHAFFER, A . A . Sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase and invertase activities in developing fruits of *Licopersicum esculentum* Mill and the sucrose accumulating *Licoprscicum hirsutum* Hum. And Bompl. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 95, p. 623-627, 1991.
- MITCHAM, E. J. AND MAC DONALD, R. E. Cell Wall Modification during ripening of "Keitt" and "Tommy Atkins" mango fruit. - **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, St. Joseph, v.117, n.6, p. 919-924, 1992.
- MORGA, N.S; LUSTRE,M.M; TUUAC,M.M;BALAGOT, A .H.; SORIAUO,M.R. Physico-chemical changes in Philipine Carabao mangoes during ripening. **Food Chem.**, Barking, v.4, p.225-254, 1979.

- MORIGUCHI, T.; ABE, K; SANADA, T.; YAMAKI,S. Levels and role of sucrose synthase, sucrose-phosphate syntase, and acid invertase in sucrose accumulation in fruit of Asian pear. **J. Am. Soc. Hortc. Sci.**, St. Joseph, v.117, n.2, p.274-278,1992.
- MORIGUCHI, T.; ABE, K; SANADA, T.; YAMAKI,S. Propertis of acid invertase purified from peach fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v.30, p.95-97, 1991.
- MOTA, R. V. da; LAJOLO, F.M & CORDENUNSI, B.R. Composição em carboidratos de algumas cultivares de banana (*Musa* spp) durante o amadurecimento. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.17, n.2, p.94-97, 1997 .
- MURATA, T. Sucrose-phosphate synthase from various plant origins. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.36, n.11, p.1877-1884, 1972.
- NASCIMENTO, J. R. O. **Purificação, caracterização parcial e expressão da sacarose-fosfato sintase durante o amadurecimento da banana.** São Paulo, 1997. 91p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- NASCIMENTO, J.R.O.; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M.; ALCOCER,M.J.C .Banana sucrose-phosphate synthase gene expression during fruit ripening. **Planta**, Berlin, v.203, p.283-288, 1997.
- PANDEY, R. M.; RAO, M. M.; SINGH, R. N. - Biochemical changes in the developing mango fruit (*Mangifera indica* L.) cv. Dashehari. **Progressive Horticulture**, v.5, p.47-59, 1974.
- PAULL, R. E. Pineapple and Papaya. In: SEYMOUR, G.B.; TAYLOR, J.E. & TUCKER, G. A. **Biochemistry of fruit ripening.** London: Chapman & Hall, 1996. p.302–315.

- PERCHERSON, F. Colorimetric determination of sucrose and fructofuranosidase by the tiobarbituric reaction. **C. R. Hebd. Seances Acad. Sci**, Paris, v.255, p.2521-2522, 1962.
- PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* wich is more generally applicable. **Anal. Biochem.**, Baltimore, v.83, p.346-356, 1977.
- PEYNAUD, E., RIBÉREAU-GAYON, P. The grape. In: HULME, A. C. **The biochemistry of fruits and their products**. New York : Academic Press, 1971. V.2, p.172 – 204.
- PICÓN, A. ; MARTÍNEZ-JÁVEGA, J. M.; CUQUERELLA,J.; DELRIO,M.A. ; NAVARRO, P. Effects of precooling, packaging film, modified atmosphere and ethylene absorber on the quality of refrigerated Chandler na Douglas strawberries. **Food Chem.** , Barking, v.48, p.189-193, 1993.
- PRESSEY, R. - Changes in sucrose synthase and sucrose phosphate synthase activities during storage of potatoes. **Am. Potato J.**, New Brunswick, v.47, p.245-51, 1970.
- PRESSEY, R., HINTON, D. M. , ADVANTS, J. K. Development of polygalacturonase activity and solubilisation of pectin in peaches during ripening. **J. Food Sci.**, Chicago, v.36, p. 1070 – 1073, 1971.
- PURGATTO,E.; LAJOLO, F.M.; NASCIMENTO, J. R. O. ; CORDENUNSI, B. R. Inhibition of α -amylase synthesis, starch degradation and sucrose formation by IAA during banana ripening. **Submitted**, São Paulo, 1999.
- REES, T. AP. Hexose phosphate metabolism by nonphotosynthetic tissues of higher plants. In: STUMPF, P.K., CONN, E.E. eds. **The biochemistry of plants - a comprehensive treatise**, London: Academic Press, 1988. v.14, p.1-30.
- SALERMO, G. L.; PONTIS, H. G. Studies on the sucrose phosphate synthetase: Kinetic mechanism. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.80, p.298-302, 1997.

- SALVUCCI, M. E., DRAKE, R.R., HALEY, B. E. Purification and photoaffinity labeling of sucrose phosphate synthase from spinach leaves. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.281, n.2, p.212 – 218, 1990.
- SEYMOUR, G.B. Banana. In: SEYMOUR,G., TAYLOR.J., TUCKER,G. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Academic Press, 1993. p.83-101.
- SHEWFELT, A. L. Changes and variations in the pectic constitution of ripening peaches as related to product firmness. **J. Food Sci.**, Chicago, v.30, p.573 - 576, 1965.
- SHEWFELT, A. L., PAYNTER, V. A., JEN,J. J. Textural changes and molecular characteristics of pectic constituents in ripening peaches. **J. Food Sci.**, Chicago, v.36, p.573 - 575, 1971.
- SUBRAMANYAM, H.; KRISHNAMURTHY, S.; PARPIA, H.A .B.- Physiology and biochemistry of mango fruit. **Adv. Food Res.**, New York, v.21, p.223-305, 1975.
- TANDON D. K. ; KALRA S. K. - Changes in sugars, starch na amylases activity during developement of mango fruit cv Dashehari. **J. Hort. Sci.**, London, v. 58, n.3, p.449-453, 1983.
- TING, S. V., ATTAWAY, J. A. Citrus Fruits. In: HULME, A. C. **The biochemistry of fruits and their products**. New York: Academic Press, 1971. V.2, p.107 – 161.
- TJIPTONO, P.; LAM, P.E.; MENDOZA, D. B. Jr. Status of the mango industry in ASEAN in mango . **ASEAN Food J.**, Kuala Lumpur, p.1-11, 1984.
- TUCKER, G. A., GRIERSON, D. Fruit in ripening. In: DAVIES, D. D., ed. **The biochemistry of plants**. Academic Press, San Diego, v.12, p.265 – 269, 1987.
- TUCKER, G. A., SEYMOUR, G. B. Cell wall degradation during mango fruit ripening. **Acta Hortic.**, Leuven, v.291, p.454 – 460, 1991.

- TUCKER, G. A . Introduction, In: SEYMOUR,G.; TAYLOR.J , TUCKER,G. eds.
Biochemistry of Fruit Ripening, London: Academic Press, cap.1, p.1-51,
1993.
- VIZZOTTO,G.; PINTON, R.; VARANINI, Z.; COSTA, G. Sucrose accumulation in
developing peach fruit. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.96, p.225-230,
1992.
- WOLOSIUK, R.A .; PONTIS, H. G. - Evidence of the existence of to forms of
sucrose synthase. **FEBS Lett.** , Amesterdam, v.16, n.4, p.237-240, 1970.
- WORRELL, A.C., BRUNEAU, J. M. , SUMMERFELT, K., BOERSIG, M. ,
VOELKER, T. A . Expression of a maize sucrose-phosphate synthase in
tomates alters leaf carbohydrate partitioning. **Plant Cell**, Rockville, v.3,
p.1121-1130, 1991.
- YANG, C. L. , SU, J. C. Quaternary structure of sucrose synthase from banana
fruits. **J. Chinese Biochem. Soc.**, China, v.9, n.2, p.100 – 101, 1980.

8. RESUMO

A manga é um fruto ainda considerado exótico, onde quase tudo relativo ao seu amadurecimento está por ser esclarecido. Pouco se conhece da sua fisiologia e bioquímica pós colheita. Os objetivos deste trabalho foram avaliar algumas variedades de mangas durante o crescimento e amadurecimento; quanto aos açúcares solúveis, amido e ácido ascórbico; a atividade das enzimas sacarose-fosfato sintase e sacarose sintase durante este mesmo período na manga Van Dyke e o perfil de respiração e etileno das variedades Van Dyke, Tommy Atkins e Haden após a colheita.

Os resultados mostraram que os perfis dos açúcares solúveis relativos ao adoçamento e seu metabolismo são altamente dependentes do cultivar e da maturidade fisiológica da manga. A sacarose foi o açúcar predominante em todas as variedades analisadas, sendo que o maior valor encontrado foi de aproximadamente 5% na manga Van Dyke. A frutose foi a hexose predominante na manga madura, e sua relação com a glicose variou de 2,5 a 48 vezes. Os teores de amido existentes quando a manga é colhida, independente da variedade, são muito baixos, menores que 3,0%. As enzimas ligadas ao metabolismo da sacarose, sacarose-fosfato sintase (SPS) e sacarose sintase (SS), tiveram a atividade aumentada na fase de amadurecimento pós colheita no cultivar Van Dyke. O teor de ácido ascórbico, na maioria das variedades diminuiu antes da colheita, exceto a manga Keitt e a manga Tommy Atkins, sendo esta a que apresentou maior teor de ácido ascórbico no fruto maduro. Não houve produção de etileno após o ponto de colheita, e foi encontrado mais de um pico de respiração nas mangas Haden e Van Dyke, resultado atípico de outros frutos climatéricos.

9. ABSTRACT

The mango ripening process and the associated physiological and biochemical changes is still poorly known. Also is unknown if the bulk of sugar is accumulated prior or after the onset of ripening. The aim of this work was to evaluate the soluble sugars, starch and ascorbic acid content during the growth and ripening of several mango varieties. The sucrose-phosphate synthase (SPS) and sucrose synthase (SS) activities were evaluated in Van Dyke mango variety. The post harvest respiration and ethylene profiles of the Van Dyke, Tommy Atkins and Haden varieties were analyzed after harvesting.

The results shown that the changes on total sugar profiles were highly dependent on the cultivar and physiological maturity. Sucrose was the predominant sugar in all analyzed varieties. The fructose amount was 2,5 to 48 times higher than glucose being the predominant hexoses in ripe fruit. The starch content of any variety of harvested mango is too low, with values under 3,0%. The sucrose related enzymes (SPS and SS), showed an increasing activity during the post-harvest ripening of Van Dyke's cultivar. For most varieties, the ascorbic acid content decreased before the harvest point, except for Keitt and Tommy Atkins mangos. The highest ascorbic acid content was found in the ripened Tommy fruit. One increase in the ethylene was not detected after harvesting. More than one respiration peak was detected for Haden and Van Dyke's varieties, this result is different of the other climateric fruit's one.