UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ENZIMÁTICA DO PROCESSO DE
ADOÇAMENTO DA MANGA 'KEITT'**

Ana Paula Fioravante Bernardes Silva

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

Orientador:
Profa. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi

São Paulo
2004

Ana Paula Fioravante Bernardes Silva

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ENZIMÁTICA DO PROCESSO DE
ADOÇAMENTO DA MANGA 'KEITT'**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

“O valor das coisas está não no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, que nós dá a vida para que possamos evoluir, desenvolver nossa inteligência e nosso coração.

Agradeço a meus amados pais, Odilon e Sônia, meus irmãos, Fábio e Marcelo, aos meus sogros, Idê e Hélio e meus cunhados, Paulo Henrique e Denise, pela presença constante e pelo amor. Aos meus familiares e amigos, todos vocês me são indispensáveis.

Ao meu amado marido, Carlos Felipe, pela dedicação, paciência, compreensão. Por ser meu companheiro, me apoiando, me segurando, me evantando, me estimulando todos os dias, sem exceção. Sendo meu “co-orientador” em todas as minhas decisões, enfim por simplesmente me amar.

Aos meus amados filhos, Felipe e Marina razão da minha vida. Antes de agradecer, peço desculpas pela falta de paciência, pela falta de tempo para brincar, ouvir histórias e contá-las. Agradeço a vocês dois por tanto amor, tanto carinho, tanta paciência, que mesmo tão pequenos são capazes de me dar incondicionalmente, e sendo assim, me tornando uma pessoa completamente feliz.

Aos anjos da guarda dos meus filhos, Aparecida, Antonieta, Cida, Lurdinha, Éster, Bia, Lúcia, Andréa, Ana Paula, Ana Cecília, Juliana, Simone, e a todos que me ajudam tomando conta dos meus tesouros, sem vocês eu não conseguiria.

A Professora Beatriz, minha amiga, minha orientadora. No dicionário orientação significa: Ato ou arte de orientar. Isso é o que simplesmente você faz com todos seus alunos. Sua presença foi sem dúvida nenhuma definitiva e indispensável durante todo meu Doutorado. Sem a sua compreensão, dedicação, além é claro de sua capacidade profissional eu não teria de forma alguma conseguido.

Ao Sr. José Rezende por me ceder as mangas, indispensáveis para este trabalho. Sempre me tratando com tanto carinho e atenção.

Aos colegas de trabalho: Rosecler, Andréia, Denise, Ricardo, Marcinha, Ana Cristina, Neuza, Jacqueline, Lúcia, Eliana, Giseli, Milana, Cíntia, Claudinha, Adair, João Paulo, Renato, Rodrigo, Maria Luiza, Alberto, Amanda, Aderuza, Gracielli, Priscila, Inês, Tânia, Paola, Walter e Ana Teresa.

Ao meu amigo Mauricio, que me ajudou nas análises de microscopias e nas aulas de Bromatologia Básica, sem você tudo teria sido mais difícil.

As minhas queridas amigas, Márcia (“mamãe ganso”), Janaína, Adriana e Fernanda, por cada sorriso, cada palavra de incentivo, cada gesto de amizade. Sem o carinho e o amor de vocês eu não teria conseguido.

Ao Prof. João, pela atenção, amizade e pela satisfação de poder compartilhar de seus conhecimentos.

Ao Prof. Eduardo, para mim o eterno “verdinho”, pela amizade, carinho e por me proporcionar um importante momento no meu Doutorado, a participação na disciplina de Bromatologia Básica, participando de sua dedicação com o ensinar.

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

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

A CAPES pela bolsa e à FAPESP pelo apoio financeiro ao laboratório.

A todos vocês muito obrigada!!!!

“Há que se cuidar do broto para que a vida nos dê flor e fruto”.

(Coração de Estudante – Wagner Tiso e Milton Nascimento)

Dedico este trabalho

**Ao futuro da minha família
e aos meus amados Carlos, Felipe e Marina.**

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Amadurecimento dos frutos.....	3
1.1.2. Etileno e respiração.....	3
1.1.3. Cor.....	5
1.1.4. Textura.....	6
1.1.5. Sabor.....	6
1.2. Carboidratos.....	7
1.2.1. Amido.....	8
1.2.2. Degradação do amido.....	13
1.3. Amadurecimento da manga.....	18
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Material.....	23
3.2. Métodos.....	23
3.2.1. Medidas de CO ₂ e etileno.....	23
3.2.2. Açúcares solúveis.....	24
3.2.3. Amido.....	25
3.2.4. Extração e atividade de α -amilase e β -amilase.....	26
3.2.5. Extração e determinação da atividade da isoamilase.....	27
3.2.6. Extração e atividade da fosforilase.....	28
3.2.7. Isolamento do grânulo de amido.....	29
3.2.8. Determinação do conteúdo de amilose.....	29
3.2.8.1. Pelo método do DSC (calorimetria diferencial de varredura)...	29
3.2.8.2. Determinação de amido total e amilose pelo método enzimático.....	29
3.2.9. Extração de proteína total e determinação de proteína.....	31
3.2.10. Extração das proteínas ligadas aos grânulos de amido (SGAPs) para eletroforese desnaturante.....	32
3.2.11. Microscopia eletrônica de varredura.....	33

4.RESULTADOS	34
4.1.Respiração e etileno.....	34
4.2.Carboidratos.....	35
4.2.1.Perfil de amido e de açúcares solúveis durante o desenvolvimento e amadurecimento da manga 'Keitt'.....	35
4.3.Perfil de atividade das amilases.....	38
4.4.Atividade da enzima desramificadora tipo isoamilase.....	40
4.5.Atividade das fosforilases.....	42
4.6.Caracterização do grânulo de amido da manga 'Keitt'.....	44
4.6.1. <i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	44
4.6.2. <i>Conteúdo de amilose no amido da manga</i>	53
4.6.3. <i>Perfil proteico em eletroforese desnaturante das proteínas totais do grânulo de amido, proteínas ligadas ao grânulo de amido e proteínas internalizadas ao grânulo de amido</i>	54
5.DISSCUSSÃO	58
6.CONCLUSÕES	65
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
8.RESUMO	79
9.ABSTRACT	81

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1	Variação dos tamanhos dos grânulos de amido observados em microscopia eletrônica de varredura durante o desenvolvimento e amadurecimento de mangas 'Keitt' em aumento de 2.000 x.....	46
TABELA 2	Porcentagem de amilose no grânulo de amido isolado da manga 'Keitt' pelo método do DSC e pelo método enzimático.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura química da amilose	9
FIGURA 2	Estrutura química da amilopectina	9
FIGURA 3	Representação esquemática das ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$ e $\alpha(1-6)$ e da estrutura semi-cristalina do grânulo de amido (adaptação de Gallant <i>et al.</i> , 1997 e Myers <i>et al.</i> , 2000)	11
FIGURA 4	Conversão de sacarose em amido, nos órgãos de estocagem de plantas. Enzimas: (a) sacarose sintase, (b) UDP glicose pirofosforilase, (c) ADP glicose pirofosforilase, (d) fosfoglicomutase, (e) amido sintase (GBSSI), (f) amido sintase e enzima ramificadora de amido, (g) ADP glicose transportadora, (h) hexose fosfato transportador, (PPI) fósforo inorgânico (Smith <i>et al.</i> , 1995).	17
FIGURA 5	Perfis de respiração e etileno em mangas do cultivar Keitt durante o amadurecimento pós-colheita	34
FIGURA 6	Perfis de carboidratos durante o desenvolvimento e a pós-colheita da manga Keitt: (A) amido, (B) glicose, (C) frutose e (D) sacarose.	36
FIGURA 7	Perfil de açúcares solúveis totais e perfil de amido durante o desenvolvimento e crescimento da manga 'Keitt'.	37
FIGURA 8	Perfil de amido (A) e atividade das enzimas α -amilase (B) e β -amilase (C), durante o desenvolvimento e amadurecimento da manga 'Keitt'.	39
FIGURA 9	Perfil de amido (A) e atividade enzimática da isoamilase com o substrato β -dextrina (B) e com glicogênio, durante o desenvolvimento e amadurecimento da manga 'Keitt'.	41
FIGURA 10	Perfil de amido (A) e atividade enzimática da fosforilase (B), durante o desenvolvimento e amadurecimento da manga 'Keitt'.	43
FIGURA 11	Perfil de síntese e degradação de amido com as fotos da microscopia eletrônica de varredura dos grãos de amido de mangas 'Keitt'.	44

FIGURA 12	Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido de mangas do cultivar Keitt aos 180 dias pós-antese (A) aumento de 500 x e (B) aumento de 2.000 x.	47
FIGURA 13	Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido de mangas do cultivar Keitt na colheita de 2.000 x.	48
FIGURA 14	Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido de mangas do cultivar Keitt aos 3 dias pós-colheita (C) aumento de 500 x e (D) aumento de 2.000 x.	49
FIGURA 15	Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido de mangas do cultivar Keitt aos 5 dias pós-colheita (E) aumento de 500 x e (F) aumento de 2.000 x.	50
FIGURA 16	Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido de mangas do cultivar Keitt aos 8 dias pós-colheita (G) aumento de 500 x e (H) aumento de 2.000 x.	51
FIGURA 17	Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido de mangas do cultivar Keitt aos 10 dias pós-colheita (I) aumento de 500 x e (J) aumento de 2.000 x.	52
FIGURA 18	Perfis eletroforéticos de proteínas totais, internalizadas ao grânulo e ligadas a superfície do grânulo de amido com padrão de peso molecular variando de 20 a 97 kDa durante o desenvolvimento e amadurecimento de mangas 'Keitt'. (A) corados com prata e (B) corados com coomassie-blue	56
FIGURA 19	Perfis eletroforéticos de proteínas totais, internalizadas ao grânulo e ligadas ao grânulo de amido com padrão de peso molecular variando de 29 a 205 kDa durante o desenvolvimento e amadurecimento de mangas 'Keitt'. (A) corados com prata e (B) corados com coomassie-blue	57

ABREVIATÓES

ABTS - 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotizolina)-6-sulfonato

ACC - ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico

ACC-sintase - S-adenosil-L-metionina metiltioadenosina liase

ACC-oxidase - 1-aminociclopropano carboxilato oxidase

BPNPG7-EPS - p-nitrofenil-maltoheptaosídeo bloqueado

B.O.D - demanda bioquímica de oxigênio

DBE - enzima desramificadora

DPA - dias pós-antese

DPC - dias pós-colheita

DNS - ácido dinitrosalicílico

HPLC - *High-Performance Liquid Chromatographic*

kDa - kilo Dalton

PAGE - (*polyacrylamide gel electrophoresis*) eletroforese em gel de poliacrilamida.

PF - peso fresco

PM - Peso molecular

PNPG5 - p-nitrofenil-maltopentaosídeo

RNM - ressonância magnética nuclear

SGAPs - starch granules-associated proteins

SGBSS - starch granule-bound starch synthase I

SuSy - sacarose sintase

SPS - sacarose-fosfato sintase

SEM - microscopia eletrônica de varredura

SDS - (*sodium dodecyl sulfate*) dodecil sulfato de sódio.

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ENZIMÁTICA DO PROCESSO DE ADOÇAMENTO DA MANGA 'KEITT'

1. INTRODUÇÃO

A manga (*Mangifera indica* Linn.) é uma dicotiledonea da família *Anacardiaceae*, originária da Ásia meridional e do arquipélago indiano, onde é cultivada há mais de 4.000 anos.

Atualmente, o maior produtor global de manga é o continente Asiático, sendo a Índia responsável por 81% desta produção. Os países que fazem parte da América Central e do Sul e o continente Africano detêm, respectivamente, 11% e 8% da produção mundial de manga (Simão, 1998).

Na América do Sul, o Brasil foi o primeiro país a cultivar a manga, sendo no momento considerado o nono produtor mundial. A produção brasileira é da ordem de 542.000 toneladas de mangas, em uma área de 70 mil hectares, sendo a maior parte desta produção (82,6%) comercializada e consumida no mercado interno, enquanto que o restante (17,4%) é exportado. Apesar da manga ser cultivada em todas as regiões fisiográficas do Brasil, o Nordeste é responsável por 53% da produção nacional e, por isto, é a principal região produtora do nosso país (FAO, 2002).

Em termos de comercialização, a manga é a quarta fruta dos trópicos a alcançar o mercado internacional. Apesar do Brasil ser apenas o nono produtor mundial, é o segundo país exportador de manga (Carvalho, 1996). A maior parte da produção é voltada para o mercado europeu e

produzida na região do Nordeste, eixo Petrolina–Juazeiro. Nesta região, as cultivares desenvolvidas são principalmente do "tipo exportação", pois levam em consideração a coloração vermelha da casca e a ausência de fibras da polpa, atrativos do mercado externo. A cultivar Tommy Atkins é responsável por 83% desta produção, enquanto que as cultivares Haden, Keitt e Kent são responsáveis, respectivamente, por 14%, 2% e 1% da produção (Cadastro Frutícola, CODEVASF, 1999).

A manga 'keitt' é uma cultivar com pouca expressão em relação ao volume de produção voltado ao mercado externo, mas pode se tornar importante por ter sabor bastante apreciado pelo consumidor e, principalmente, por poder ser colhida na entressafra de março a maio. Este último aspecto é relevante economicamente visto que confere ao Brasil a capacidade de exportar manga o ano todo. Estudos que venham aumentar o conhecimento sobre a cultivar no que concerne ao metabolismo pós colheita, poderão auxiliar nos tratamentos do fruto para exportação ou aumento do consumo no mercado interno. Este trabalho se propôs estudar a degradação do amido para a síntese e acúmulo de açúcares solúveis que concorrem para o adoçamento da manga 'Keitt'.

1.1. AMADURECIMENTO DOS FRUTOS

O amadurecimento é um processo complexo e geneticamente programado, que culmina em alterações de cor, textura, sabor e aroma dos frutos (Alexander & Grierson, 2002). É parte do processo natural que dá início à senescência e envolve numerosas e complexas mudanças bioquímicas e fisiológicas. Nos frutos climatéricos, ocorre um aumento das taxas de respiração e de produção de etileno que antecede o amadurecimento, seguido da síntese e/ou degradação de pigmentos específicos, além de mudanças nos carboidratos, ácidos orgânicos, lipídios, substâncias fenólicas, componentes voláteis e polissacarídeos estruturais (Seymour *et al.*, 1996; Lalel *et al.*, 2003).

1.1.1. Etileno e respiração

O etileno é um hormônio produzido pela maioria dos tecidos vegetais em níveis relativamente baixos, algo em torno de $0,05 \mu\text{L} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, de fruto fresco (Tucker 1993). É sintetizado a partir de intermediários do ciclo da metionina ou ciclo de Yang (Theologis 1992). A S-adenosil-metionina é convertida no ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), pela S-adenosil-L-metionina metiltioadenosina liase, (ACC sintase - EC 4.4.1.14). Em seguida, o ACC é convertido para etileno pela enzima 1-aminociclopropano carboxilato oxidase (ACC oxidase - E.C. 1.4.3), além de gás carbônico e ácido cianídrico, na presença de oxigênio.

Os frutos estão classificados em climatéricos e não climatéricos, de acordo com o padrão respiratório e a produção de etileno que antecede o amadurecimento. Os climatéricos são os que tem um aumento de respiração e de etileno durante a fase de amadurecimento, o que não acontece com os frutos não-climatéricos, que possuem padrão respiratório quase constante e níveis de etileno muito baixos durante este processo. Além disso, o fruto climatérico tem o amadurecimento induzido pelo suprimento de etileno exógeno e o não-climatérico não. A banana, o abacate, a maçã, a pêra, a manga e o tomate são considerados frutos climatéricos, enquanto que o morango, a laranja, a uva, o abacaxi e a cereja não são climatéricos (Biale & Young, 1962).

Tanto os frutos climatéricos como os não-climatéricos são capazes de produzir etileno, mas apenas nos primeiros esta síntese pode ocorrer de maneira autocatalítica, ou seja, o próprio hormônio induz a expressão das enzimas responsáveis por sua produção. A partir daí surgiu a proposta da existência de dois sistemas de produção do hormônio (McMurchie *et al.*, 1972). O chamado Sistema I, que seria responsável pela produção de níveis basais de etileno que atua tanto nos frutos climatéricos como nos não-climatéricos e também nos tecidos vegetativos. E o Sistema II, que atuaria exclusivamente nos frutos climatéricos e seria caracterizado pelo elevado aumento na produção de etileno, em níveis muito acima dos basais. Esta teoria tem ganho força em anos recentes, em vista da caracterização da expressão diferencial de isoenzimas da ACC sintase associadas a cada um dos sistemas (Barry *et al.*, 2000).

É importante ressaltar que estudos recentes vêm sinalizando a existência de vias de regulação gênicas independentes do etileno, mesmo nos frutos climatéricos atuantes durante o amadurecimento. E também que frutos não-climatéricos tem genes induzidos pela aplicação exógena de etileno (Alonso *et al.*, 1995). É muito provável que os mecanismos de controle do amadurecimento sejam resultado de uma complexa interação entre diferentes fitohormônios como o etileno, o ácido abscísico, as giberelinas, as auxinas, além de outros grupos de substâncias como os carboidratos e as poliaminas (Tucker, 1993; Lufford, 1995; Giovannoni, 2001).

1.1.2. Cor

As mudanças de cor da casca e polpa são as transformações mais facilmente notáveis nos frutos e um dos critérios mais utilizados pelo consumidor para julgar seu grau de amadurecimento. Durante o amadurecimento dos frutos, ocorrem mudanças graduais na coloração da casca com o desaparecimento da cor verde e o aparecimento de cores que variam desde o amarelo até o vermelho. Estas mudanças são dependentes de luz e envolvem a degradação da clorofila e a síntese de pigmentos como os carotenóides e as antocianinas. A clorofila se encontra nos cloroplastos e está associada aos carotenóides, que são precursores da vitamina A. Com a sua degradação ocorre o desmantelamento do aparato da fotossíntese. As antocianinas são glicosídeos provenientes de compostos fenólicos,

normalmente encontrados nos vacúolos das células (Awad, 1993; Paull, 1996).

1.1.3. Textura

Durante o amadurecimento ocorre o amaciamento do fruto, que pode ser causado por perda de água, pela degradação do amido ou pela degradação da parede celular, isoladamente ou em conjunto. A perda de água, que pode variar de 5 a 10% do peso fresco do fruto, acarreta a diminuição da turgidez do fruto (Tucker, 1993). A degradação do amido também determina alterações de textura, como aquelas demonstradas em frutos com elevado teor de amido na sua composição, como a banana e o kiwi (MacRae *et al.*, 1992). Contudo, o mecanismo mais importante que envolve a mudança de textura é a degradação da parede celular, particularmente da lamela média que é rica em polissacarídeos (Tucker, 1993). A hidrólise dos componentes da lamela média (pectinas, hemiceluloses e celulosas), por enzimas como as galactosidases, as pectinametilesterases, as poligalacturonases e as celulasas, provoca o amaciamento da maioria dos frutos (Awad, 1993; Huber, 1983).

1.1.4. Sabor

O sabor é resultado de uma sensação complexa que envolve o paladar, o aroma, a aparência, o comportamento durante a manipulação, a sensação na boca e os sons produzidos durante a mastigação (Awad, 1993). Os compostos que mais contribuem para o sabor são as substâncias voláteis relativas ao aroma, as substâncias fenólicas, os açúcares solúveis e os ácidos orgânicos. O sabor doce é um equilíbrio entre os açúcares

solúveis e os ácidos orgânicos e, em geral, durante o amadurecimento dos frutos ocorre a síntese e o acúmulo de açúcares solúveis e a degradação de ácidos orgânicos. Os açúcares solúveis mais freqüentemente encontrados nos frutos são a glicose, a frutose e a sacarose. Os ácidos orgânicos mais freqüentemente encontrados nos frutos maduros são os ácidos cítrico e málico (Seymour *et al.*, 1996).

A banana, o kiwi e a maçã (Inaba, 1993; Treptow *et al.*, 1995) são frutos que acumulam altas quantidades de amido durante a fase de desenvolvimento. A banana acumula cerca de 20% de amido, que é degradado durante o amadurecimento, com concomitante acúmulo de açúcares solúveis (cerca de 16%), principalmente de sacarose (Arêas & Lajolo, 1981). O kiwi acumula por volta de 15% de amido, que é degradado durante o amadurecimento com o acúmulo simultâneo de cerca de 9% de açúcares (MacRae *et al.*, 1992). Estas mudanças ocorrem de maneira coordenada e tem a participação de fitohormônios e de enzimas (Tucker & Grierson, 1984).

1.2. CARBOIDRATOS

Os açúcares solúveis e os ácidos orgânicos são assimilados fotossinteticamente e utilizados como substratos para a respiração, desenvolvimento do fruto, etc. Os principais açúcares solúveis encontrados nos frutos são glicose, frutose e sacarose e os principais ácidos orgânicos encontrados são o ácido málico e o cítrico (Tucker, 1993).

Alguns frutos, como a laranja, o morango e a uva, dependem exclusivamente da planta para acumularem açúcares solúveis suficientes para seu adoçamento e só devem ser colhidos depois do amadurecimento ser completado. Outros possuem como reserva de carbono, amido suficiente para adoçar o fruto após a colheita, como a banana e o kiwi. Uma terceira classe, como o mamão, completa seu volume de açúcares depois da colheita, às custas, provavelmente, de ácidos orgânicos e da parede celular (Gomez *et al.*, 2002, Tucker, 1993). A manga parece ser dependente da cultivar, já que algumas são colhidas praticamente maduras, com o máximo de açúcares já armazenado e outras não (Bernardes-Silva *et al.*, 2003).

1.2.1. Amido

O amido é a principal fonte de reserva de carboidratos dos vegetais. É um polissacarídeo formado predominantemente por dois homopolissacarídeos de glicose: a amilose e a amilopectina. Estas cadeias quando organizadas formam uma macroestrutura altamente condensada denominada de grânulo. Os grânulos de amido são formados e armazenados nos amiloplastos, no caso do amido de reserva, ou nos cloroplastos como no caso de reserva temporária de energia e carbono (Sivak & Preiss, 1998). A estrutura destes grânulos de amido é muito complexa e varia entre plantas e tecidos (Gallant *et al.*, 1997).

A amilose (Figura 1) é uma molécula linear composta de resíduos de unidades α -D-glicopiranosil unidas por ligações glicosídicas α -1,4 e raras ligações α -1,6. Por outro lado, a amilopectina (Figura 2) é uma

molécula altamente ramificada, com cerca de 4-5% de ligações α -1,6 em sua estrutura.

Figura 1: Estrutura química da amilose

Figura 2: Estrutura química da amilopectina

Embora muitos estudos tenham se concentrado na elucidação do processo de formação do grânulo de amido, a forma como ocorre o empacotamento das cadeias de amilose e amilopectina para sua formação e

a arquitetura do grânulo de amido ainda não estão estabelecidos. Atualmente, a teoria mais aceita para a estrutura do grânulo de amido é a proposta por Gallant *et al.* (1997) e Myers *et al.* (2000), que estabeleceram quatro níveis crescentes de complexidade e organização do grânulo de amido, quais sejam, as cadeias A e B (Figura 3) que formam a amilopectina (escala de 0.1 a 1 nm de dimensão), as lamelas cristalinas e amorfas da amilopectina formariam os "blocklets" (Figura 3A-D). Os "blocklets" parecem ter formas e tamanhos variados, todavia, de maneira geral, teriam entre 20 e 500 nm de diâmetro, com formato arredondado e liso. Os "blocklets" embebidos em material amorfo por sua vez, formariam os anéis de crescimento cristalinos e semi-cristalinos, com tamanho variando de 120 a 500 nm. Os anéis se alternam em regiões cristalinas sólidas e semi-cristalina "moles", originadas de "blocklets" maiores e menores, respectivamente (Figura 3D). Além disso, especula-se que as regiões semi-cristalinas teriam maior quantidade de amilose na sua composição do que regiões cristalinas. Foi constatada também a presença de canais radiais (poros) no grânulo de amido de algumas fontes vegetais, constituídos de regiões semi-cristalinas e de material amorfo (Figura 3 E). Do ponto de vista funcional, estas áreas confeririam maior flexibilidade ao grânulo e maior suscetibilidade à degradação enzimática (Gallant *et al.*, 1997).

Figura 3: Representação esquemática das ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$ e $\alpha(1-6)$ e da estrutura semi-cristalina do grânulo de amido (adaptação de Gallant *et al.*, 1997 e Myers *et al.*, 2000).

Além da amilose e da amilopectina, os grânulos de amido contêm, em quantidades muito pequenas, proteínas, lipídios e minerais (principalmente fósforo). As proteínas e os lipídios são bem mais abundantes e tecnologicamente mais importantes que os minerais, sendo que a quantidade exata destes componentes associados ao amido é variável e depende da origem botânica da espécie analisada. De maneira geral e a depender do grau de purificação do amido durante a sua extração, uma amostra típica de amido de cereais pode conter aproximadamente 0,25% de proteína e até 1% de lipídios, enquanto que uma raiz ou tubérculo (batata) tem cerca de 0,05% de proteína e de 0,05 a 0,1% de lipídios (Baldwin, 2001).

As proteínas associadas aos grânulos de amido, podem ser classificadas em dois tipos: proteínas de armazenamento como o glúten e a gliadina e proteínas associadas ao grânulo de amido (starch granules-associated proteins - SGAPs). As SGAPs são biologicamente distintas das proteínas de armazenamento das plantas e podem ter atividade enzimática e estar associadas à síntese ou à degradação do grânulo de amido (Baldwin, 2001). Baldwin (2001) caracterizou as proteínas encontradas na superfície do grânulo como sendo sempre de baixo peso molecular (PM) (5 a 30 kDa) e as proteínas internalizadas no grânulo de amido como sendo as de maior PM (60, a 149 kDa). Porém, Mota *et al.* (2002) encontraram proteínas de alto e baixo PM tanto na superfície quanto internalizada ao grânulo de amido de banana, o que invalida a classificação de Baldwin (2001).

A mais abundante e mais conhecida proteína interna do

grânulo de amido é uma amido-sintase (starch granule-bound starch synthase I – SGBSS). Esta isoforma é encontrada somente ligada ao grânulo, tem PM ao redor de 60 kDa e é responsável pela síntese de amilose no grânulo de amido. Em amidos com baixo teor ou nenhuma amilose, as SGBSSs apresentam baixa ou nenhuma atividade (Peng *et al.*, 2000).

Diversas técnicas de microscopia tem sido úteis na elucidação da estrutura do grânulo de amido. Dentre elas, a microscopia eletrônica de varredura (SEM), que tem sido uma técnica amplamente utilizada no estudo da morfologia dos amidos nativos. A análise das imagens obtidas através da SEM permite a obtenção de informações sobre a estrutura do grânulo e as transformações que ele sofre num processo de degradação, por exemplo.

1.2.2. Degradação do amido

Apesar da vasta literatura sobre o assunto, a degradação do amido é ainda muito pouco conhecida. Pode ter a participação potencial das amido-fosforilases, das amilases, das glicosidases e das enzimas desramificadoras, mas não se descarta a possibilidade de enzimas não conhecidas até o momento terem parte no processo.

As α -amilases (E.C. 3.2.1.1) hidrolisam aleatoriamente as ligações α -1,4 da amilose e da amilopectina, gerando uma mistura de oligossacarídeos, dextrinas e glicose. As isoformas da α -amilase são as únicas enzimas conhecidas capazes de iniciar o processo de degradação do grânulo de amido. Sua velocidade de ação parece ser extremamente

dependente das suas propriedades cinéticas, de outras enzimas degradativas, além da fonte botânica e do tamanho do grânulo de amido (Beck & Zeigler, 1989; Sivak & Preiss, 1998). Witt *et al.* (1995), demonstraram haver a necessidade de uma ligação prévia da amilase ao grânulo de amido, a fim de que o processo de degradação seja iniciado. Esta ligação é ainda pouco conhecida, mas parece ser dependente de outros fatores como dos produtos de degradação do amido, em particular da maltose que inibe o sítio de ligação da enzima ao grânulo e da temperatura em que ocorre o complexo enzima-amido: quanto mais alta, menor a quantidade de enzima ligada.

As amido-fosforilases (E.C.2.4.1.1) podem, em teoria, atuar tanto na síntese quanto na degradação do amido. Estudos mostram haver duas formas de fosforilase capazes de clivar as ligações α -1,4, das extremidades redutoras do amido liberando glicose-1-fosfato. Contraditoriamente, a isoforma encontrada no amiloplasto é a que tem menor afinidade por substratos de alto peso molecular e a isoforma citoplasmática é que mostra menor afinidade por substratos de baixo peso molecular (Mota *et al.*, 2002).

A β -amilase (E.C.3.2.1.2) cliva apenas a penúltima ligação glicosídica α -1,4 da extremidade não redutora de glicanos lineares, liberando moléculas de maltose. Purgatto *et al.* (2001), observaram que na banana a β -amilase parece ser um monômero de 56 kDa, com aumento pronunciado de atividade e de expressão durante a fase de degradação do amido. A idéia de que a degradação do amido seja uma ação conjunta principalmente de

uma endo-amilase (α -amilase) e uma exo-amilase (β -amilase) atuando em conjunto, vem se consolidando à medida que se detecta tanto atividade quanto proteína ligada ao grânulo de amido relativas às duas enzimas (Wang *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2003; Purgatto *et al.*, 2001; Dunn, 1974).

As α -1,4 glicosidases (E.C.3.2.1.10) atuam sobre o produto da ação da β -amilase (maltose), produzindo 2 moléculas de glicose, mas já foi demonstrado que outras isoformas de glicosidases podem atuar sobre glucanos maiores como maltotriose até a amilopectina (Kossmann & Lloyd, 2000). Com isso, não se descarta que as glicosidases estejam atuando diretamente na degradação do amido, não apenas sobre produtos de degradação de outras enzimas.

Com o avanço da degradação do amido (Figura 4), os monômeros de glicose são convertidos em glicose-6P para glicose-6P, pela ação da fosfoglicomutase (E.C.5.4.2.5.). A glicose-6P pode ainda ser interconvertida em frutose-6P, pela fosfoglicose isomerase (E.C.5.3.1.9) que fornece substrato para que as enzimas sacarose sintase (SuSy- EC.2.4.1.13) e sacarose-fosfato sintase (SPS - E.C. 2.4.1.14) produzam sacarose a partir da UDP-glicose e frutose-6-fosfato. Porém, nenhuma destas enzimas é capaz de degradar as ligações glicosídicas do tipo α -1,6, sendo necessária a presença de uma enzima desramificadora de amido que atue sobre as dextrinas-limite e oligossacarídeos ramificados produzidos pela ação das demais enzimas que degradam o amido. Segundo Manners (1989), as enzimas desramificadoras (DBE) são divididas em 2 classes, de acordo com sua especificidade pelo substrato: pululanases (microrganismos)

ou dextrinases-limite (vegetais) (E.C.3.2.1.41), que atuam sobre ligações α -1,6 de pululano, amilopectina e suas dextrinas, mas não sobre o glicogênio e as isoamilases (E.C.3.2.1.68), que clivam ligações α -1,6 de amilopectina e glicogênio, porém não atuam sobre o pululano.

Acredita-se que a DBE seja muito importante durante o amadurecimento de frutos, visto que na molécula de amido, a quantidade de amilopectina pode ser até 4 vezes maior que a de amilose e que um grande número de ligações α -1,6 precisam ser hidrolisadas. Uma vez que todo o amido presente nas frutas desaparece, concomitantemente ao aumento de hexoses, e não restando dextrinas remanescentes, acredita-se que pelo menos uma DBE esteja presente no processo de transformação amido-sacarose de certos frutos. Por isso num estudo de degradação de amido, é necessário investigar a presença das DBEs.

Figura 4: Conversão de sacarose em amido, nos orgãos de estocagem de plantas. Enzimas: (a) sacarose sintase, (b) UDP glicose pirofosforilase, (c) ADP glicose pirofosforilase, (d) fosfoglicomutase, (e) amido sintase (GBSSI), (f) amido sintase e enzima ramificadora de amido, (g) ADP glicose transportadora, (h) hexose fosfato transportador, (P_i) fósforo inorgânico (Smith *et al.*, 1995).

1. 3. AMADURECIMENTO DA MANGA

A manga é um fruto classificado como climatérico que, dependendo do cultivar, acumula até 8% de amido durante o desenvolvimento, sendo praticamente todo degradado durante o amadurecimento do fruto. O processo de amadurecimento começa com o fruto ainda ligado à árvore e, em algumas cultivares, não são observadas mudanças marcantes, exceto de textura, após a colheita (Bernardes-Silva *et al.*, 2003). Existem poucas informações na literatura a respeito do amadurecimento da manga e ainda menos dos processos relativos ao adoçamento deste fruto. Resultados obtidos em trabalho anterior (Bernardes-Silva *et al.*, 2003), mostraram que a degradação do amido e a síntese dos açúcares solúveis tanto pode ser iniciada antes da colheita, a exemplo das cultivares Van Dyke e Haden, quanto só começar após a colheita como no caso da cultivar Keitt.

Poucos trabalhos focalizam a degradação do amido e a síntese de açúcares solúveis da manga, bem como as enzimas correlacionadas. Além disso, apesar da manga ser classificada como sendo um fruto climatérico, ainda não se estabeleceu quando ocorre o climatério, se antes ou depois da colheita. Há trabalhos que mostram que o fruto já possui altos níveis de etileno endógeno ainda ligado à árvore e várias mudanças ligadas ao amadurecimento acontecem antes da maturação fisiológica (Cua *et al.*, 1990). Em trabalho anterior (Bernardes-Silva, 2000), obtivemos resultados com frutos a partir do segundo dia após a colheita e observamos nas cultivares Van Dyke e Haden pequenos aumentos de etileno e CO₂ logo

após a colheita e nenhum aumento significativo na cultivar Tommy Atkins. Isto é bastante interessante e mostra mais uma vez que quase tudo relacionado ao metabolismo da manga está por ser esclarecido.

O amido na manga é descrito como sendo a principal reserva de carbono utilizada na síntese pós-colheita de sacarose, açúcar apontado como predominante na manga madura (Subramanyam *et al.*, 1975; Bernardes-Silva *et al.*, 2003). Este amido é acumulado na manga da cultivar Keitt tanto durante a fase de desenvolvimento quanto na pós-colheita, atingindo um teor aproximado de 8% no 5º dia pós-colheita, onde se dá o início do processo de degradação (Bernardes-Silva *et al.*, 2003).

Os principais açúcares solúveis acumulados na manga durante o desenvolvimento e amadurecimento são a glicose, a frutose e a sacarose. A frutose foi o açúcar predominante durante a formação do fruto na maioria das cultivares estudadas, exceto na cultivar Van Dyke. Após a colheita até o completo amadurecimento, a sacarose predominou em todas as cultivares, exceto na “Tommy Atkins”, onde a frutose se manteve com principal açúcar (Bernardes-Silva *et al.*, 2003).

O montante de sacarose acumulado não é explicado somente pela degradação pós-colheita do amido. Observamos em trabalho anterior (Bernardes-Silva *et al.*, 2003), que a síntese da sacarose nem sempre esteve temporalmente correlacionada com a degradação do amido, como no caso das cultivares Haden e Tommy Atkins, havendo um espaço de pelo menos 40 dias entre o começo da degradação do amido e o teor máximo de sacarose. De maneira geral, a quantidade de amido degradado não foi

suficiente para justificar a quantidade de sacarose acumulada, o que faz supor que parte dos açúcares solúveis responsáveis pelo adoçamento da manga, é acumulada via fotossíntese nas folhas. Um exemplo disso é a cultivar Tommy Atkins que ao final do amadurecimento ainda tinha 45% do seu teor inicial de amido, sendo a cultivar com o maior teor de sacarose no mesmo período, em relação às outras cultivares analisados. A exceção foi a cultivar Keitt, com uma estreita correlação entre a degradação do amido e a síntese de sacarose (Castrillo *et al.*, 1992; Bernardes-Silva *et al.*, 2003). Esta cultivar teve todo o amido acumulado na fase de formação do fruto, degradado durante o seu amadurecimento. Além disso, a cultivar Keitt apresentou a maior soma de açúcares solúveis (cerca de 6,5%), com predominância da sacarose, quando comparada às outras cultivares.

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). Em mangas dos cultivares Van Dyke (Bernardes-Silva, 2000) e Haden (Castrillo *et al.*, 1992) foram observados um aumento de atividade da SS na fase de síntese de sacarose. Este fato é intrigante uma vez a SS não teria função durante o amadurecimento do fruto, pois se credita a SPS a catálise da síntese de sacarose.

Segundo Fucks *et al.*, (1980) e Tandon & Kalra, (1983) as atividades das α -amilases na manga aumentam com o desenvolvimento do fruto, paralelamente com o aumento do peso. Em frutos verdes, colhidos e armazenados a 20°C, o conteúdo de amido começa a decair gradativamente, seguido por um substancial aumento da atividade das

amilases. E em frutos maduros, são detectados apenas traços de amido e atividade das amilases bem reduzida.

A maioria dos trabalhos disponíveis para consulta utilizaram cultivares pouco conhecidas de manga e poucos avaliaram a participação de enzimas ligadas ao seu amadurecimento. O complexo metabolismo amido-sacarose que ocorre na manga ainda está por ser esclarecido, pois os resultados existentes na literatura são poucos, confusos e conflitantes.

O conhecimento do perfil carboidratos (amido e açúcares solúveis) aliado à atividade das enzimas que degradam o amido e ao perfil de proteínas associadas ao grânulo de amido, permite o avanço no conhecimento da via metabólica que atua na degradação do amido da manga 'Keitt'. Assim, a proposta deste trabalho foi avaliar as atividades de algumas enzimas relacionadas ao metabolismo amido-sacarose e caracterizar a estrutura do grânulo de amido em mangas da cultivar Keitt.

2. OBJETIVOS:

- Objetivo Geral

Estudar a degradação do amido ligada ao adoçamento da manga 'Keitt'.

- Objetivos Específicos

- avaliar o padrão respiratório e produção de etileno;
- avaliar os perfis de amido e açúcares solúveis;
- avaliar a atividade das enzimas relacionadas com a degradação do amido;
- caracterizar o grânulo de amido da manga 'Keitt'.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material:

Mangas da cultivar Keitt foram obtidas da região de Joanópolis (SP), em duas fases: (1) durante a maturação fisiológica, com 90, 120 e 180 dias pós antese (dpa) e (2) durante o amadurecimento. Para os testes relativos ao amadurecimento, as amostras foram coletadas com cerca de 207dpa e armazenadas em câmara tipo B.O.D (demanda bioquímica de oxigênio), 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.

3.2. Métodos

3.2.1. Medidas de CO₂ e Etileno

Três frutos, no ponto comercial de colheita, foram mantidos em câmara do tipo B.O.D (demanda bioquímica de oxigênio) 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 com seringas de 1mL para CO₂ e 10 mL

para etileno, uma amostra do gás encerrado no frasco.

O CO₂ e o etileno foram medidos através de cromatografia gasosa (Cromatógrafo modelo HP 6890), onde o etileno foi detectado por ionização de chama (FID) e o CO₂ por detector de condutividade térmica (TCD). Em ambos o caso 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 Tight, 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 a 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 a 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.

3.2.2. Açúcares solúveis

Os açúcares solúveis foram extraídos homogeneizando-se cerca de 0,4g da amostra em 3 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 x g por 30 minutos. A extração foi repetida três vezes, os sobrenadantes combinados e o volume final corrigido com etanol para 10

mL. A partir de uma alíquota de 1 mL, o etanol foi evaporado a vácuo a 43°C (em sistema de speed vac) e o resíduo retomado em água. Os açúcares solúveis foram identificados e quantificados, através de HPLC (Cromatógrafo Dionex modelo DX 500) acoplado a detector de pulso amperométrico, utilizando coluna CarboPac PA1 (Dionex), em corrida isocrática com fluxo de 1mL/min de NaOH (18mM).

3.2.3. Amido

A hidrólise do amido foi feita baseada no método de Stitt *et al.*, (1978). As análises de amido foram feitas no resíduo proveniente da extração dos açúcares solúveis (método 3.2.2). O resíduo precipitado foi seco a vácuo por 12 horas a 43°C (em sistema speed vac), e homogeneizado em cerca de 2 a 3 mL de água e autoclavados a 121°C/104 Kgf/cm² por 2 horas e 40 minutos. Porções desta suspensão resultante (2 mL contendo até 0,36 mg de amido) foram incubadas em 2 mL de 0,2M de tampão acetato contendo 14 U de amiloglicosidase adicionada de 0,4 U de α -amilase por 2 horas a 37°C. A mistura foi centrifugada a 3500 x g por 10 minutos e a glicose resultante no sobrenadante foi quantificada pelo sistema glicose-oxidase-peroxidase/ABTS (Bergmeyer, 1974).

3.2.4. Extração e Atividade de α -amilase e β -amilase

Cerca de 0,5 g de amostra foi homogeneizado em 2,5 mL de solução extratora em Turrax, por 30 segundos. A solução extratora foi composta por Tampão Hepes-KOH 50 mM pH 8,0, contendo 1mM de benzamidina; 1% PVP e 20 mM de cisteína. No homogenato resultante foi medida a proteína total segundo Bradford, (1976). Para a atividade da α -**amilase** foi medida utilizando o reagente Ceralpha (Megazyme Internacional Ireland, Ltd) composto pelo substrato p -nitrofenil-maltoheptaosídio, bloqueado na extremidade não-redutora (BPNPG7-EPS), e α -glicosidase. O bloqueio do terminal não-redutor impede a ação da β -amilase e fosforilases, tornando este substrato específico a ação de α -amilases. Após a incubação a 37°C por 1 hora de 50 μ L do extrato enzimático com 50 μ L do reagente, a reação foi interrompida com a adição de 750 μ L de Tris 1%. A absorbância do p -nitrofenol liberado foi lida a 410 nm e sua concentração determinada com base na curva-padrão de p -nitrofenol. Para a atividade da β -**amilase** foi medida conforme descrito por McCleary & Codd (1989). A mistura de reação (100 μ L) constituiu-se de tampão fosfato de sódio 36 mM (pH 7,0) 2 U de α -glicosidase (Sigma), 0,25 μ L de p -nitrofenil-maltopentaosídio (PNPG5; Sigma) e 50. μ L do extrato enzimático. O meio de reação foi interrompida pela adição 750 μ L de Tris 1%. A absorbância do p -nitrofenol liberado foi lida a 410 nm e sua concentração determinada com base na curva-padrão de p -nitrofenol.

3.2.5. Extração e Determinação da atividade da Isoamilase

O meio extrator foi preparado conforme Fujita *et al.*, (1999) com modificações. Cerca de 1 g de amostra de manga foi homogeneizada, em Turrax por 30 segundos, em 4 mL de meio extrator constituído de 50 mM de tampão Imidazol-HCl (pH 7,4), contendo 20 mM cisteína (neutralizada no momento do uso), 1 mM benzamidina, 1% PVP e 500 mM MgCl₂. Após centrifugação a 15000 x g por 50min, parte do sobrenadante (0,25 mL) foi dessalinizado em coluna Hi-Trap Sephadex G-25 (Amersham Biosciences). A atividade enzimática foi determinada na fração (1 mL) com maior teor protéico (Bradford, 1976) e menor teor de açúcares (Dubois, 1956).

A atividade da Isoamilase foi medida baseada na determinação de açúcares redutores formados durante a degradação de polímeros glicanos, medidos através do método do ácido dinitrosalicílico (DNS) segundo Bernfeld (1955), utilizando maltose como padrão.

Foram utilizados 2 substratos distintos: glicogênio e β -dextrina. O meio de reação foi constituído de 100 μ L de tampão Imidazol-HCl 100 mM (pH 7,4) contendo MgCl₂ 16 mM e 2% de glicogênio e 100 μ L da amostra dessalinizada. A reação foi interrompida, após incubação de 2 horas a 30°C, pela adição de 100 μ L de DNS, fervura por 10 minutos e adição de 900 μ L de água, com um volume final de 1200 μ L por tubo (Sigma). Foi lida a absorbância a 540 nm e os resultados expressos em nmol maltose/mg proteína/h. Para o substrato β -dextrina, a atividade foi determinada da mesma forma com apenas uma modificação no tempo de incubação que passou para 1 hora e no meio de reação se utilizou 5 % de β -dextrina.

3.2.6. Extração e Atividade da Fosforilase

Para a extração das proteínas, cerca de 1g de amostra de manga foi homogeneizada em Turrax com solução extratora composta de tampão Hepes-KOH 50mM (pH 7,5), contendo: 20 mM EDTA; 20mM de cisteína, 1% de PVP (m/v) e 1mM de benzamidina. Após a centrifugação a 12000 x g por 10 minutos a 4°C, foi coletado o sobrenadante onde foram feitos os ensaios de atividade. A atividade foi medida no sentido da degradação do amido pela liberação de glicose-1-P a partir do amido solúvel de batata a 2% em água, conforme descrito por Arêas & Lajolo (1981). O meio de reação, num volume total de 500 μ L, constituiu-se de 150 μ l de tampão Tris-maleato 50 mM pH 7,5; 100 μ L de amido solúvel 2% (m/v), 50 μ L de NaF 50 mM, 100 μ L de extrato enzimático e 100 μ L de Na₂HPO₄ 0,5M. Após 1 hora a 30°C, a reação foi interrompida por incubação em banho fervente por 5 minutos. A glicose-1-P formada foi determinada enzimaticamente após a sua conversão em glicose-6-fosfato, pela fosfoglicomutase (Sigma) seguida da formação de glicuronídeo mais NADPH pela glicose-6-fosfato desidrogenase (Sigma). A concentração de NADPH foi medida pela leitura de absorbância a 340 nm. Pela estequiometria das reações, cada molécula de NADPH formada originou uma molécula de glicose-1-fosfato. A proteína foi determinada segundo Bradford (1976).

3.2.7 Isolamento do grânulo de Amido

Cerca de 25 g de amostra foram homogeneizadas em cerca de 60 mL de solução extratora por 20 segundos em gelo. A solução extratora foi composta por Tampão Hepes-KOH 100 mM pH 8,0, contendo 1mM EDTA, 5 mM DTT, 0,5 mM PMSF e 0,05% de TritonX-100. O homogenato resultante foi passado por uma membrana de Nylon (100 μ m mesh). O filtrado foi centrifugado a 2000 x g por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado.

A solução de amido foi colocada no topo de uma solução de 95 % de Percoll (Pharmacia) e 5 % de Hepes-KOH 0,5 M pH 7,0, deixado por 1 hora em repouso em temperatura ambiente e centrifugado por 15 minutos a 2000 x g. O pellet com os grãos de amido foi lavado por 3 vezes com tampão de extração e secos sob vácuo e armazenados a -80°C para análises posteriores (Ritte *et al.*, 2000).

3.2.8 Determinação do conteúdo de amilose

3.2.8.1 Pelo método do DSC (Calorimetria diferencial de varredura)

Aproximadamente 6 mg de amido isolado foram pesados diretamente em placas de aço de 50 μ L (Perkin Elmer), usando uma balança de precisão de 0,01 mg. Em seguida, foram adicionados 30 μ L de uma solução L- α - Lysophosphatidylcholine (LPC) 2 % (m/m em água). A

panela foi lacrada e deixada em repouso por 1 hora para estabilizar a solução.

Como padrão de amilose foi utilizada a amilose de batata tipo III (Sigma). Neste caso, cerca de 3 mg foram pesados em panelas de aço de 50 μ L (Perkin Elmer), seguida a adição de 30 μ L da solução LPC 2%.

As análises foram realizadas em equipamento DSC-7 (Perkin Elmer) conforme Mestres *et al.*, (1996), utilizando uma panela com 30 μ L de água como referência, água com gelo como meio de resfriamento e nitrogênio como gás de arraste. A exoterma da amilose pura foi checada em duplicata a cada dia. O escaneamento foi feito a uma taxa de 15°C/min., de 35 a 160°C por 2 minutos e esfriou-se a 10°C/min. até 35°C.

O conteúdo de amilose foi determinado comparando-se a área da exoterma do padrão de amilose e da amostra formadas durante o resfriamento, como demonstrado por Mestres *et al.*, (1996).

3.2.8.2 Determinação de Amido Total e Amilose pelo método enzimático

As análises de amido total e amilose foram feitas segundo método enzimático utilizando-se um kit da Megazyme. A 25 mg de amostra foi adicionado 1 mL de dimetilsufóxido, fervido por 15 minutos e levados ao volume de 25 mL com tampão ConA (Solução 1). **Para a amilose:** 1 mL desta solução 1 foi transferida para um tubo de microcentrifuga, adicionando 500 μ L de tampão ConA. Após 1 hora em repouso e centrifugação (3000 x g por 10 min.) o sobrenadante foi transferido para um tubo Corex de 15 mL,

onde foi adicionado 3 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4,5). Após 5 minutos de fervura foi adicionado 100 µL de amiloglicosidase/α-amilase, incubado por 30 minutos e centrifugado (3000 x g por 5 min.). Em 500 µL do sobrenadante adicionou-se 2 mL de GODPOD, sendo lida em espectrofotômetro a 510 nm após incubação a 40°C por 20min. **Amido total:** Para cada 500 µL da solução 1 adicionou-se 100 µL de amiloglicosidase/α-amilase e incubou-se a 40°C por 10min., adicionando-se 2 mL de GOD/POD para cada 500 µL da solução, que foi lida em espectrofotômetro a 510 nm após incubação a 40°C por 20 min. O cálculo de % de amilose foi feito a partir da divisão da absorbância da amilose pela absorbância do amido total multiplicado por um fator de 66,8.

3.2.9. Extração de Proteína Total e Determinação de Proteína

Cerca de 0,5 g de amostra foi homogeneizado por 30 segundos em solução extratora composta de tampão Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), contendo 2 % de SDS e 5 % mercaptoetanol. Após 10 minutos de fervura e centrifugação a 7650 x g por 50 minutos recolheu-se o sobrenadante e foi determinado a proteína segundo o método de Lowry *et al.*, (1951), modificado por Peterson, (1977).

3.2.10. Extração das proteínas ligadas aos grânulos de amido (SGAPs) para de eletroforese desnaturante

As extrações das proteínas ligadas ao grânulo de amido foram feitas através do método de Ritte, *et al.*, (2000), com modificações. Os padrões usados para as eletroforeses foram o de 14,1 a 97 kDa e o de 29 a 205 kDa.

Para **proteína total**, em 20 mg de amido seco foram adicionado 600 µl de tampão desnaturante (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; 10 % SDS (m/v), 10 % glicerol; 20 mM DTT e 0,005 % de bromophenol blue). Após o aquecimento da suspensão a 95°C por 5 minutos, esta foi centrifugada a 22000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido. Os extratos protéicos obtidos foram concentrados com acetona na proporção 1:1, mantidos por 1 hora em freezer a -20°C e centrifugados a 11000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com uma mistura de acetona:éter na proporção de 1:1, centrifugado e o sobrenadante foi desprezado. Nesse precipitado, foi adicionado 25 µL de tampão Laemmli e, aplicado em gel de poliacrilamida em SDS 8 % .

Para a **proteína ligada à superfície do grânulo**, 20 mg do amido seco foram incubados em tampão desnaturante por 15 minutos à temperatura ambiente, sob agitação constante, sendo então, centrifugado a 22000 x g por 5 minutos. O sobrenadante coletado foi aquecido a 95°C por 5 minutos e concentrado com acetona da mesma forma que no item anterior.

Para a **proteína interna ao grânulo**, o pellet remanescente da extração anterior foi ressuspendido em tampão desnaturante e aquecido a

95°C por 5 minutos. Após resfriamento e centrifugação a 22000 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi recolhido e também concentrado com acetona.

3.2.11. Microscopia Eletrônica de Varredura

Uma porção de grão de amido isolado (método 3.2.7) foi fixada com o auxílio de etanol 98% a um “Stubs” (peça de metal utilizada para a análise neste tipo de microscopia, com diâmetro de 12-13 mm), o material foi mantido em uma câmara com sílica para evitar absorção de umidade. O material a ser analisado, foi submetido a um processo de metalização com ouro por 90 segundos, para posterior análise microscópica (Berlyn & Miksche, 1976; Silveira, 1989). As eletromicrografias de varredura foram obtidas com o auxílio de um microscópio MEV Zeiss DSM-940 e filme TMAX 120; as escalas foram impressas diretamente na eletromicrografia.

4. RESULTADOS:

4.1. Respiração e etileno

A Figura 6 mostra que existe um pico de respiração no 8º dia pós colheita e um dia após um pico de etileno. Os valores máximos são baixos, de $0,1 \mu\text{L} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de etileno e de $45 \text{ mL} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de CO_2 , se comparados com outros frutos climatéricos. Além disso, ocorreram no fruto já maduro.

Figura 5: Perfis de respiração e etileno em mangas do cultivar Keitt durante o amadurecimento pós-colheita.

4.2. Carboidratos

4.2.1. Perfil de amido e de açúcares solúveis durante o desenvolvimento e amadurecimento da manga 'Keitt'

É visível (Figura 6A) que já existe amido armazenado na manga 'Keitt' aos 90 dias pós antese (dpa), mas o acúmulo é acentuado somente após 120 dpa, chegando ao máximo de 7,8 % no terceiro dia 3 dia depois da colheita (máximo de 7,8 %). Este teor foi mantido até o 5º dia pós-colheita quando começou o processo de degradação.

A análise dos açúcares solúveis (Figuras 6 B, C e D), mostrou que durante o desenvolvimento e o amadurecimento da manga 'Keitt' houve acúmulo de glicose, frutose e sacarose, não sendo detectada a presença de outros açúcares. Os teores de glicose não ultrapassaram 1,5 %, enquanto o conteúdo de frutose aumentou constantemente ao longo do desenvolvimento e amadurecimento. No 9º dia pós-colheita, o teor de frutose foi de aproximadamente 3,3% e a relação glicose/frutose em torno de 2,5 vezes. A sacarose foi o principal açúcar solúvel encontrado no fruto maduro, com cerca de 5,3% no 9º dia pós-colheita (Figura 6 D). O início do acúmulo da sacarose se deu a partir do 5º dia pós-colheita, coincidindo com o início da degradação do amido.

Figura 6: Perfis de carboidratos durante o desenvolvimento e a pós-colheita da manga Keitt: (A) amido, (B) glicose, (C) frutose e (D) sacarose.

O total máximo de açúcares solúveis acumulado foi de aproximadamente 9,8% no 9º dia pós-colheita, coincidindo com o menor teor de amido (Figura 7). A análise conjunta dos teores de amido e de açúcares totais ao longo do desenvolvimento e amadurecimento da manga 'Keitt' revelou haver diminuição dos teores de amido e aumento dos teores de açúcares totais, de maneira gradativa e constante, de modo que pode-se creditar praticamente todo o teor final de açúcares solúveis ao carbono acumulado na forma de amido.

Figura 7: Perfil de açúcares solúveis totais e perfil de amido durante o desenvolvimento e crescimento da manga 'Keitt'.

4.3. Perfil de atividade das amilases

A atividade da α -amilase aumentou cerca de 20 vezes durante o desenvolvimento (~90 a ~208 dpa) da manga 'Keitt', de modo constante e em paralelo com o acúmulo de amido e com o aumento de peso do fruto (Figura 8A e 8B). Depois da colheita, a atividade da α -amilase foi flutuante, com dois picos, um no terceiro dia e outro no 8 dpc. Estas oscilações entre os menores e os maiores valores de atividade foram de pelo menos 4 vezes.

A atividade da β -amilase foi praticamente inexpressiva durante o desenvolvimento do fruto, mas aumentou muito durante o amadurecimento da manga. O aumento de atividade foi de aproximadamente 500 vezes entre a primeira amostragem (~90 dpa) e a última (10 dpc), concentrado entre o 5º e o 10º dias pós colheita, período este coincidente com a degradação do amido. O aumento de atividade da β -amilase ocorreu quase que exclusivamente durante o amadurecimento da manga, coincidindo com o início da degradação do amido (Figura 8 A) e da síntese de sacarose (Figura 6 D).

Figura 8: Perfil de amido (A) e atividade das enzimas α -amilase (B) e β -amilase (C), durante o desenvolvimento e amadurecimento da manga 'Keitt'.

4.4. Atividade da enzima desramificadora tipo isoamilase

Foram utilizados dois substratos distintos para determinar a atividade das isoamilases na manga 'Keitt': um de baixo peso molecular (β -dextrina) e outro de alto peso molecular (glicogênio). Para ambos os substratos foram observados picos de atividade na fase do desenvolvimento do fruto (Figura 9). Com a β -dextrina o pico ocorreu aos 180 dpa (401,38 nmol maltose/mg prot/h) e com o glicogênio aos 120 dpa (293,05 nmol maltose/mg proteína/h). Após a colheita aparece um perfil oscilante de atividade para ambos os substratos

A atividade da isoamilase sobre a β -dextrina (Figura 9 B), variou de 100 a 450 nmol maltose/mg proteína/h entre o desenvolvimento e amadurecimento. Durante o amadurecimento, manteve uma atividade relativamente constante até o 4º dia pós-colheita iniciando uma diminuição de atividade até o final do amadurecimento. A queda na atividade da isoamilase com esse substrato nesse ponto coincide com o início da degradação do amido (Figura 9 A).

A atividade da isoamilase sobre o glicogênio (Figura 9 C), foi praticamente constante durante todo o período de degradação do fruto, com um aumento de atividade no 9º dia pós-colheita, quando praticamente todo o amido já estava degradado (Figura 9 A).

Figura 9: Perfil de amido (A) e atividade enzimática da isoamilase com o substrato β -dextrina (B) e com glicogênio, durante o desenvolvimento e amadurecimento da manga 'Keitt'.

4.5. Atividade das fosforilases

Pode-se observar na figura 10 (B), que a atividade das fosforilases na manga parece ser mais importante durante o período de síntese e acúmulo de amido (Figura 10 A), do que com a degradação, apresentando um pico aos 120 dias pós- antese com valores próximos a 43,71 nmol g-1P/ mg proteína/ minuto. Na colheita, a atividade das fosforilases caiu pela metade, mantendo-se constante durante a pós-colheita. O perfil aqui observado para as fosforilases foi muito semelhante ao perfil da isoamilase sobre glicogênio (Figura 9 C).

Figura 10: Perfil de amido (A) e atividade enzimática da fosforilase (B), durante o desenvolvimento e amadurecimento da manga 'Keitt'.

4.6. Caracterização do grânulo de amido da manga 'Keitt'

4.6.1 Microscopia eletrônica de varredura

Para melhor compreensão dos eventos relacionados ao metabolismo do amido na manga, foram isolados grânulos de amido de pontos significativos na curva de síntese e degradação de amido, ou seja, aos 180 dias pós-antese, na colheita (207 dpa), e aos 3, 5, 8 e 10 dias pós-colheita (Figura 11).

Figura 11: Perfil de síntese e degradação de amido com as fotos da microscopia eletrônica de varredura dos grãos de amido de mangas 'Keitt'.

Todas as amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura em dois aumentos de imagem para que, além de visualizar mudanças na superfície do grânulo de amido durante o desenvolvimento e amadurecimento do fruto, pudéssemos também visualizar melhor a frequência de tamanho dos grânulos nos pontos analisados.

Os grânulos de amido da manga 'Keitt' (Figuras 12 A, 12 B e 13) tiveram formato arredondado, superfície "lisa" e tamanho pequeno ($\sim 20 \mu\text{m}$), se comparado com o amido da banana (80 a $500 \mu\text{m}$) por exemplo. A tabela 1 apresenta uma estimativa, sem validade estatística, da variação do tamanho dos grânulos durante o desenvolvimento (180 dpa e a colheita) e amadurecimento pós-colheita (3, 5, 8 e 10 dpc). Os grânulos maiores ($\sim 20 \mu\text{m}$) foram os dos frutos amostrados no terceiro dia após a colheita, coincidindo com o máximo teor de amido da manga (7,8 %).

Este tamanho diminuiu durante a fase do amadurecimento do fruto por corrosão superficial, já que não são observados canais ou poros, característico de amido de cereais em degradação. Parece haver um ligeiro achatamento dos grânulos que ficam em "pedaços" de variados tamanhos (Figuras 14, 15 e 16). A degradação desses grânulos fica bastante aparente nos grânulos de amido isolados de mangas 10 dias após a colheita (Figura 17), onde estão menores e praticamente amorfos.

Tabela 1: Variação dos tamanhos dos grânulos de amido observados em microscopia eletrônica de varredura durante o desenvolvimento e amadurecimento de mangas 'Keitt' em aumento de 2.000 x.

dias	Tamanho (μm)
180 dpa	13,57
Colheita	16,43
3 dpc	19,28
5 dpc	13,57
8 dpc	7,86
10 dpc	6,43

Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido de mangas do cultivar Keitt aos 180 dias pós-antese (A) aumento de 500 x e (B) aumento de 2.000 x.

Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido de mangas do cultivar Keitt na colheita de 2.000 x.

Figura 14: Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido de mangas do cultivar Keitt aos 3 dias pós-colheita (C) aumento de 500 x e (D) aumento de 2.000 x.

E

F

Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido de mangas do cultivar Keitt aos 5 dias pós-colheita (E) aumento de 500 x e (F) aumento de 2.000 x.

Figura 16: Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido de mangas do cultivar Keitt aos 8 dias pós-colheita (G) aumento de 500 x e (H) aumento de 2.000 x.

Figura 17: Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido de mangas do cultivar Keitt aos 10 dias pós-colheita (I) aumento de 500 x e (J) aumento de 2.000 x.

4.6.2. Conteúdo de amilose no amido da manga

O conteúdo total de amilose do amido da manga 'Keitt' foi determinado através de 2 metodologias distintas (tabela 2). Uma através de Calorimetria diferencial de varredura (DSC), que mede a entalpia de fusão dos complexos formados entre a amilose e fosfolipídeos adicionados à amostra e a outra através de método enzimático (kit Megazyme).

Tabela 2: Porcentagem de amilose no grânulo de amido isolado da manga 'Keitt' pelo método do DSC e pelo método enzimático.

Dias	Teor de amido	% de amilose	
	mg amido/ g PF manga	DSC	Enzimático
180 dpa	61,99 ± 6,16	24,50 ± 1,51	23,02 ± 0,46
PC	58,88 ± 5,07	24,11 ± 1,64	21,88 ± 0,41
3	77,67 ± 1,79	24,45 ± 1,73	24,89 ± 0,88
5	67,67 ± 9,06	24,94 ± 2,78	23,74 ± 0,31

As análises foram feitas em amidos extraídos de mangas com 180 dias pós-antese, na colheita (207 dpa), no 3º dia pós-colheita e 5º dia pós-colheita. O conteúdo de amilose na manga foi de, aproximadamente, 25%, em todas as amostras e nem entre os métodos.

4.6.3. Perfil protéico em eletroforese desnaturante das proteínas totais do grânulo de amido, proteínas ligadas ao grânulo de amido e proteínas internalizadas ao grânulo de amido.

Supondo-se que as enzimas devem aderir ao grânulo de amido para degradá-lo, a análise do perfil de proteínas aderidas ao grânulo, poderia fornecer indicações de quais enzimas seriam importantes neste processo. Assim, os grânulos de amido foram isolados de pontos-chave do acúmulo e degradação do amido, de maneira a preservar as enzimas com atividade no grânulo. Nestas amostras foram analisados os perfis de proteínas totais, proteínas ligadas à superfície do grânulo e internalizadas ao grânulo de amido de manga 'Keitt'. Em razão de proteínas que coram com coomassie-blue e não coram com prata, os géis foram feitos em duplicata e corados das duas maneiras (Figuras 18). Outra duplicata foi feita com padrões variando de 29 a 205 kDa, para melhorar a possibilidade de identificação do peso molecular das proteínas encontradas (Figura 19).

As Figuras 18 e 19 mostram claramente um aumento no número de proteínas ligadas aos grânulos e na quantidade de algumas delas ligadas à superfície dos grânulos de amido isolados de mangas em amadurecimento. Surpreendentemente foi encontrado este aumento também no perfil das proteínas internas aos grânulos de amido.

A banda protéica mais abundante, portanto mais visível, tanto corada com prata quanto com coomassie, é uma proteína com cerca de 62 kDa que, supõe-se, seja a amido sintase, sempre encontrada no interior do

grânulo de amido. Chama a atenção também, pelo aparecimento na superfície dos grânulos de amido de mangas com 3 dias pós-colheita, de uma banda com peso molecular calculado em 59 kDa e outra com 97 kDa.

Figura 18: Perfis eletroforéticos de proteínas totais, internalizadas ao grânulo e ligadas a superfície do grânulo de amido com padrão de peso molecular variando de 20 a 97 kDa durante o desenvolvimento e amadurecimento de mangas 'Keitt'. (A) corados com prata e (B) corados com coomassie-blue.

Figura 19: Perfis eletroforéticos de proteínas totais, internalizadas ao grânulo e ligadas ao grânulo de amido com padrão de peso molecular variando de 29 a 205 kDa durante o desenvolvimento e amadurecimento de mangas 'Keitt'. (A) corados com prata e (B) corados com coomassie-blue.

5. DISCUSSÃO

A cultivar 'Keitt' foi escolhida para este estudo por ter um padrão singular de amadurecimento, pois não amadurece antes da colheita e não sofre abscisão da árvore. Além disso, o amido acumulado durante a fase de formação do fruto é todo degradado após a colheita, o que torna possível estudar todo o ciclo de degradação do amido e acúmulo de açúcares solúveis na manga. Em outras cultivares este ciclo começa antes da colheita, tornando muito difícil a obtenção de amostras representativas. Os resultados obtidos para etileno e CO₂, em trabalho anterior (Bernardes-Silva, 2000), suscitaram dúvida se os picos de etileno e de respiração, típicos de frutos climatéricos, já haviam acontecido antes da colheita dos frutos, ou se a manga tem um climatério atípico, com vários pequenos picos de respiração e etileno. Os resultados aqui apresentados mostram que, realmente, a manga não tem grande produção de CO₂ e de etileno antes do amadurecimento. Cua *et al.* (1990) mediram aumento de etileno endógeno e do precursor do etileno, o 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) e concluíram que o climatério acontece cerca de 10 dias antes da colheita da manga "Carabao". Ainda assim, os valores seriam mais baixos do que 0,1 µL/Kg. A Figura 5 mostra a ocorrência de picos relativos a quantidades muito pequenas de CO₂ e etileno na manga 'Keitt' já madura. Todos os resultados encontrados na literatura mostram que o conteúdo de etileno na manga é muito baixo, variando entre 0,1 e 0,2 µL de etileno kg de fruto por hora, durante todo o amadurecimento (Bender & Brecht, 2000 e Bernardes-Silva, 2000). Os baixos valores encontrados tanto para etileno quanto para CO₂

neste trabalho e na literatura consultada, reforçam a necessidade de haver mais estudos no sentido de saber se há um sistema 2 de síntese de etileno atuante na manga. Se uma cultivar que tem todo o ciclo de amadurecimento fora da árvore não mostra perfis de respiração e etileno típicos de fruto climatérico, talvez seja o caso de se questionar se o fruto é, de fato, climatérico e dirigir estudos para solucionar esta questão.

Estudos recentes mostram que o amadurecimento dos frutos é o resultado de um equilíbrio entre o etileno e outros hormônios como as giberelinas, as auxinas e alguns carboidratos, que atuam neste processo após a colheita do fruto, influenciando na degradação do amido e no acúmulo de açúcares solúveis (Purgatto *et al.*, 2002, Rossetto *et al.*, 2003). O intervalo entre a colheita e o início da degradação do amido observado na cultivar Keitt, pode ser interpretado como um período onde hormônios de juvenilidade veiculados pela planta-mãe, seriam consumidos permitindo que somente 5 dias após a colheita o amido começasse a ser degradado. Este intervalo de tempo e o fato do fruto não sofrer abscisão, torna esta cultivar ideal para estudos de influência de hormônios no amadurecimento de frutos.

O amido acumulado durante o desenvolvimento da manga 'Keitt' (7,8 %) foi totalmente degradado e convertido para cerca de 10 % de açúcares solúveis na manga madura. Este resultado é próximo ao encontrado para outras cultivares como Haden e Tommy Atkins (12 %) e o Van Dyke (7,3 %) (Bernardes-Silva *et al.*, 2003). Assim como a banana, que acumula de 9 a 20% dependendo da cultivar (Mota *et al.*, 1997), ou ainda o mamão com cerca de 11% (Gomez *et al.*, 1999). Ao contrário de outras

cultivares estudadas até o momento (Krisnamurthy *et al*, 1973; Hubbard *et al*, 1991, Castrillo *et al*, 1992, Bernardes-Silva *et al*, 2003), o conteúdo total de açúcares solúveis da manga 'Keitt', pode ser creditado ao carbono armazenado na forma de amido durante o desenvolvimento e degradado durante o amadurecimento do fruto.

As enzimas conhecidas por participar da degradação do amido tiveram sua atividade analisada durante o período de desenvolvimento e amadurecimento da manga. A α -amilase teve aumento constante de atividade durante o desenvolvimento do fruto e dois picos de atividade durante o amadurecimento, sugerindo haver isoformas com diferentes funções. A β -amilase claramente está ligada à degradação do amido, com aumento de atividade inversamente proporcional ao conteúdo de amido, num único pico, sugerindo não haverem isoformas com diferentes funções atuando. O perfil de atividade da β -amilase (Figura 8C) foi muito semelhante ao encontrado na banana (Purgatto, 2001 e Rossetto, 2001). Além das amilases foram estabelecidos os perfis de atividade das amido-fosforilases e das isoamilases. O perfil das fosforilases (Figura 10) sugere que elas devem ser mais importantes durante o período de síntese do amido do que na sua degradação. A literatura mostra que as amido-fosforilases tem atuação ainda desconhecida na degradação do amido, demonstrado pela aparente incoerência de ter uma isoforma com afinidade por substratos de baixo peso molecular dentro do amiloplasto e outra isoforma com afinidade por substratos de alto peso molecular no citosol (Mota *et al.*, 2002). Quanto à isoamilase, é a primeira vez que a atividade desta enzima é detectada

durante o desenvolvimento de frutos e a segunda vez durante o amadurecimento pós-colheita (Banana - Bierhals, 2003). Os perfis de atividade das isoamilases (Figura 9) tanto durante a síntese do amido quanto na sua degradação, com diferentes picos sugere, de novo, a atuação de diferentes isoformas atuando nas duas fases do fruto. Além disso, perfis diferentes de atividade sobre os dois substratos, um de baixo peso molecular (β -dextrina) e outro de alto peso molecular (glicogênio), mostrou que, provavelmente existem diferentes formas da isoamilase com afinidade por substratos de alto e baixo peso molecular. O glicogênio é o único substrato capaz de diferenciar a atividade da isoamilase da pululanase (Rahman, *et al.*, 1998), porém, não é o ideal para análises de atividade da isoamilase, pois pode ser hidrolisado pelas amilases contidas no extrato protéico, superestimando resultados (Bierhals, 2003). A preferência pela β -dextrina poderia ser explicada pelo fato do substrato ser um composto de menor tamanho, obtido a partir da ação degradativa da β -amilase sobre a amilopectina. A β -dextrina teria então uma estrutura e composição aparentemente mais favoráveis à atividade da isoamilase, com uma menor atuação remanescente das outras enzimas amilolíticas (Bierhals, 2003). A atividade das isoamilases durante o desenvolvimento do fruto seria desramificar o excesso de ramificações produzidas pelas enzimas ramificadoras de amido (Manners, 1985). E no amadurecimento atuaria como desramificadora do amido até maltose. Um fator importante observado para essa enzima na manga foi a colheita. Para ambos os substratos a enzima apresentou uma queda de atividade durante esse evento.

Outra abordagem para elucidar a degradação do amido é estudar modificações estruturais do grânulo e o perfil de enzimas ligadas ao grânulo de amido. As microscopias (Figura 12-17) aqui obtidas para os amidos isolados de amostras de mangas, em diferentes estágios de desenvolvimento e amadurecimento, mostram grânulos de tamanho pequeno (máximo 20 μm), de formato arredondado e liso, que com a degradação mostram achatamentos no formato e diminuição no tamanho, chegando a 6 μm , quando a manga está madura (Tabela 1). O teor de amilose (Tabela 2) deste amido, situa-se em torno de 25 % e não varia durante o amadurecimento. A literatura classifica os amidos em tipo A e tipo B, de acordo com a sua cristalinidade (Gallant *et al.*, 1997). Os do tipo A são em geral pequenos (até 50 μm), com baixos teores de amilose, encontrados nos cereais. Os do tipo B, tem tamanho grande (até 500 μm), altos teores de amilose e são encontrados nos tubérculos e em alguns frutos como a banana. Por estes parâmetros, o amido da manga não se encaixa em nem um dos dois tipos: tem teor de amilose alto demais para ser do tipo A e tamanho pequeno demais para ser do tipo B. Estudos de cristalinidade, através de raios-X, ou de RMN, poderão elucidar esta questão. Quanto ao formato, o único relato encontrado na literatura é de Kaur *et al.*, (2004), que também observaram grânulos pequenos, mas alongados e com a presença de poros em 5 cultivares indianos de mangas (Chausa, Totapuri, Kuppi, Langra e Dashehari).

Quanto às proteínas ligadas ao grânulo de amido observadas por eletroforese em condições dissociantes, chama a atenção a diferença do

número de bandas protéicas que aparecem tanto na superfície quanto no interior do grânulo, depois da colheita da manga. Entre elas, pela importância na degradação do amido, o aparecimento de uma banda com peso molecular calculado em 59 kDa e outra com 97 kDa, na superfície dos grânulos de amido (3 dpc). Pode-se especular que a primeira pode ser uma subunidade da β -amilase (Purgatto *et al.*, 2001) e a segunda da amido-fosforilase (Mota *et al.*, 2002), mas a identidade definitiva só poderia ser estabelecida por western blotting ou pela análise da composição em aminoácidos das bandas protéicas. Além disso, inúmeras bandas de baixo peso molecular (~20 kDa) aparecem nas mesmas amostras, o que pode revelar que as proteínas chamadas de reserva talvez tenham uma importância ainda não estabelecida na degradação do amido. Testes preliminares em extratos protéicos obtidos de amido da manga, nas diferentes amostras, não tiveram sucesso em medir a atividade tanto da α -amilase quanto da β -amilase. Além disso, extratos de proteínas extraídas da superfície do amido da manga, foram testados por western blotting para fosforilases, utilizando anticorpo produzido para a fosforilase da banana, não encontrando reação positiva para a presença delas na superfície do amido da manga. O que pode significar duas coisas: ou o anticorpo da fosforilase de banana não tem afinidade com a fosforilase da manga ou a fosforilase da manga não está associada ao grânulo.

6. CONCLUSÕES

O perfil de respiração e etileno da manga 'Keitt' é atípico para uma fruto climatérico, indicando que o fruto pode ter o climatério antes da colheita ou não ser um fruto climatérico.

Ao contrário do que indica a literatura para outros cultivares, o amido da manga 'Keitt' pode ser considerado, quase que exclusivamente, como a fonte de carbono para síntese dos açúcares solúveis, principalmente a sacarose.

A degradação do amido da manga têm a participação de α -amilases, β -amilase e isoamilases e potencial participação das amido-fosforilases.

O grânulo de amido da manga 'Keitt' é constituído por cerca de 25% de amilose, têm tamanho pequeno, é redondo, têm superfície lisa e sofre corrosão superficial durante o processo de degradação do amido, sem a presença de poros visíveis por SEM. Após a colheita aumenta o número de bandas de proteínas de alto e baixo peso molecular ligadas ao grânulo de amido, indicando que várias proteínas (enzimas) ainda não conhecidas participam do processo de degradação do grânulo de amido.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAZAWA, T., OKAMOTO, T. Biosynthesis and Metabolism of sucrose. In: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. (eds.) **The Biochemistry of Plants**, v.3, The Acad. Press, New York, p.199-270, 1980.
- ALEXANDER, L., GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climateric fruit ripening. **Journal of Experimental botany**, v.53, n.377, p.2039-2054, 2002.
- ALONSO, J.M., CHAMARRO, J., GRANELL, A. Evidence for the involvement of ethylene in the expression of specific RNAs during maturation of the orange, a non-climateric fruit. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.29, p.385-390, 1995.
- ARÊAS, J.A .G & LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening I: the phosphorylase and phosphatase behavior in *Musa acuminata* .**Journal Food Biochemistry**, Westport, v.5, p.19-37, 1981.
- AWAD, M. Fisiologia pós-colheita de frutos - **Editora Nobel**, São Paulo. P.114, 1993.BALDWIN, P. M. Starch granule - associated proteins and polypeptides: a review. **Starch/Stärke**, Weinheim ,v.53, p.475-503, 2001.
- BARRY, C.S., LLOP-TOUS, M.I., GRIRSON, D. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from System-1 to System-2 ethylene synthesis in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v.123, n.3, p.979-986, 2000.

BENDER, R. J., BRECHT, J. Respiração e produção de etanol e de etileno em mangas armazenadas sob diferentes concentrações de dióxido de carbono e oxigênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.5, p.865-871, 2000.

BERGMEYER, H. U. ed. **Methods of enzymatic analysis**. 2 ed. New York: Academic Press, 1974, v.3, p.1212–1215.

BERNARDES-SILVA, A.P.F. **Perfil de carboidratos de diferentes cultivares de manga durante o desenvolvimento e amadurecimento**. São Paulo, 2000, 52p. (Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

BERNARDES-SILVA, A.P.F., LAJOLO, F.M., CORDENUNSI, B.R. Evolução dos teores de amido e açúcares solúveis durante o desenvolvimento e amadurecimento de diferentes cultivares de manga. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n.23, p-116-120, 2003.

BERNFELD, P. Amylases, alpha and beta. **Methods in Enzymology**, San Diego, v.1, n.149-158, 1955.

BIALE, J., YOUNG, R.E. 1962. The biochemistry of fruit maturation. Endeavour 21, 164 - 174. Apud: FRENKEL, C., HAARD, N. F. Role of auxin in the regulation of fruit ripening. IN: HAARD, N. F., SALUNKHE, D. K., eds. **Postharvest biology and handling of fruits and vegetables**. Westport: The AVI Publishing Company, Inc. 1975, cap.3, p.19-34.

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, Universidade Federal de Pelotas).

BIERHALS, J.D. **Enzima desramificadora de amido tipo-isoamilase durante o amadurecimento de bananas (*Musa acuminata* AAA, Grupo Cavendish, cv. Nanicão).** São Paulo, 2003, 93p. (Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

BORÉN, M., LARSSON, H., FALK, A., JANSSON, C. The barley starch granule proteome-internalized granule polypeptides of the mature endosperm. **Plant Science**, Shannon, v.166, p.617-626, 2004.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.

CARVALHO, J.M. **Comercialização de frutos de qualidade : a importância dos tratamentos pós-colheita.** Lavras, Universidade Federal de Viçosa, 173p., 1996.

CASTRILLO, M. KRUGER, N.J., WHATHEY, F.R. Sucrose metabolism in mango fruit during ripening, **Plant Science**, Shannon, v.84, n.45-51, 1992.

CODEVASF. Cadastro frutícola 1999 do Vale do São Francisco. Brasília: **CODEVASF**, 1999.

CUA, A.U., LIZADA, M.C.C. Ethylene production in the "Carabao" mango (*mangifera indica* L.) fruit during maturation and ripening. **Acta Horticulture**, Leuven, v.269, p.169-179, 1990.

- DAVIES, C.; ROBINSON, S.P. Sugar Accumulation in Grape Berries – Cloning of two Putative Vacuolar Invertase cDNAs and their expression in Grapevine tissues. **Plant Physiology**, Bethesda, v.111, p.275–283, 1996.
- DUBOIS, M., GILES, K. A, HAMILTON, J.K., REBERS, P. A and SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and substances. **Analytical Chemistry**, v.28, 350 p., 1956.
- DUNN, G. A model for starch breakdown in higher plants. **Phytochemistry**, Kiel, v.13, p.1341-1346, 1974.
- FAO-Food and Agriculture Organisation of the United Nations. (2002). FAOSTAT Statistics data-base - agriculture. Rome, Italy.
- FUCKS, Y., PESIS, E.; ZAUBERMANG. Changes in amylase activity, starch and sugar contents in mango fruit pulp. **Scientia Horticulturae**, Israel, v.13, p.155-160, 1980.
- FUJITA, N., KUBO, A, FRANCISCO, P., NAKAKITA, M., HARADA, K., MINAKA, H., NAKAMURA, Y. Purification, characterization, and cDNA structure of isoamylase from developing endosperm of rice. **Planta**, Berlim, v.208, p.283-293, 1999.
- GALLANT, D.J., BOUCHET, B., BALDWIN, P.M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, v.32, p.177-191, 1997.
- GARCIA, E. **Transformações do amiloplasto e participação de enzimas amilolíticas no amadurecimento da banana**. São Paulo, 1983, 72p. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP).

- GARCIA, E. LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening: the amylase and glucosidade behavior. **Journal of Food Science**., Chicago, v.53, n.4, p.1181–1186, 1988.
- GIOVANNONI, J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.52, n.725-749, 2001.
- 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. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, n.2, p.246-252, 1999.
- GOMEZ, M.L.A; LAJOLO, F.M.; CORDENUNSI, B.R. 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.
- GOMEZ, M.L.P.A. **Metabolismo do ácido ascórbico durante o desenvolvimento e amadurecimento da manga (*Mangifera indica* L. var. Keitt) e amadurecimento da goiaba branca (*Psidium guajava* L. var. Paloma)**. São Paulo, 2003, 102p. (Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP).
- HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, v.45, p.253-267, 2001.
- HUBBARD, N.L., PHARR, D.M., HUBER, S.C. Sucrose-phosphate Synthase and other sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species. **Physiologia Plantarum**, 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**. Acad. Press, London and New York, cap.6, p.233 -254, 1971.

INABA, A . Recent studies on postharvest physiology and technology of horticultural crops in Japan. **Postharvest News and Information**, London, v.4, n.4, p.101N -104N, 1993.

KAUR, M. SINGH, N., SANDHU, K. S., GURAYA, H. S. Physicochemical, morphological, thermal and reological properties of starch separated from Kernels of some Indiam mango cultivars (*Mangifera indica* L.). **Food Chemistry**, v.85, p.131-140, 2004.

KOSSMANN, J., LLOYD, J. Understanding and influencing starch biochemistry. **Critical Reviews in Plant Science**, v.19, n.3, p.171–226, 2000.

KRISHNAMURTY, S. SUBRAMANYAM, H. Pre- and post-harvest physiology of the mango fruit: a review. **Tropical Science**, Oxford, v.15, p.167–193, 1973.

LALEL, H. J. D., SINGH, Z., TAN, S.C. Aroma volatiles production during fruit ripening of " Kensington Pride" mango. **Postharvest Biology and Technology**, v.27, p.323-336, 2003.

LELOIR, L.F., CARDINI, C. E. The biosynthesis of sucrose phosphate. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 214, p.157–165, 1955.

LIZADA, C. Mango, In: SEYMOUR,G.; TAYLOR. J and TUCKER, G. **Biochemistry of fruit ripening**. London, cap.8, p.255-271, 1993.

- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., RANDHALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.193, p.265–275, 1951.
- LUFFORD, P.M. Postharvest hormone changes in vegetables and fruit. In: DAVIES, P.J ed. **Plant hormones**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, cap.G12, p.725-750, 1995.
- MAAREL, M.J.E.C VAN DER, VEEN, B. VAN DER, UITDEHAAG, J.C.M., LEEMHUIS, H., DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch - converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v.94, p.137-155, 2002.
- MANNERS, D. J. Starch. In: DEY, DIXON, R. A ., eds. Biochemistry of storage carbohydrates in green plants. **Academic** , New York:, cap.4, p.185–186, 1985.
- MANNERS, D.J. Recent developments in our understanding of amylopectin structure. **Carbohydrate Polymers**, v.11, p.87-112, 1989.
- MACRAE, E.; QUICK, W.P.; BENKER, C.; STITT, M. Carbohydrate metabolism during postharvest ripening in Kiwi fruit. **Planta**, Berlim, v.188, p.314-323, 1992.
- MCCLEARY, B.V., CODD, R. Measurement of beta-amylase in cereal flours and commercial enzyme preparations. **Journal of Cereal Science**., London, v.9, n.1, p.17-33, 1989.
- MCMURCHIE, E.J., MCGLASSON, W.B., EAKS, I.L. Treatment of fruit with propylene gives information about biogenesis of ethylene. **Nature**, London, v.237, n.5352, p.235-236, 1972.

- 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, kandlering and Utilization of Tropical and Subtropical Fruits and Vegetables**. Westport: Avipub; Co, 1975. p.103-127.
- MEDLICOTT, A.P., THOMPSON, A. K. Analysis of sugars and organic acids in ripening mango fruits (*Mangifera indica* L. cv Keitt) by high performance liquid chromatography. **Journal of the Science of Food and Agriculture.**, v.36, p.561 -566, 1985.
- MESTRES, C., MATENCIO,F., PONS, B., YAJID,M., FLIEDEL,G. A rapid method for the determination of amylose content by using differential-scanning calorimetry. **Starch/Stärke**, Weinheim, v. 48, n.1, p.2-6, 1996.
- MOTA, R. V. da; LAJOLO, F.M & CORDENUNSI, B.R. Composição em carboidratos de algumas cultivares de banana (*Musa* spp) durante o amadurecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.17, n.2, p.94-97, 1997.
- MOTA, R. V. da. **Identificação, purificação e caracterização parcial da enzima amido fosforilase em bananas nanicão (*Musa acuminata* - Grupo Cavendish)**. São Paulo, 2001, 93p. (Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. - USP).
- MOTA, R. V. da., CORDENUNSI, B. R., NASCIMENTO, J.R.O.do., PURGATTO, E., ROSSETTO, M. R. M., LAJOLO, F. M. Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening. **Planta**, Berlin, v.216, p.325-333, 2002.

MONROE, J.D., PREISS, J. Purification of a β - amylase that accumulates in *Arabidopsis thaliana* mutants defective in starch metabolism. **Plant Physiology**, Bethesda, v.94, p.1033-1039, 1990.

MYERS, A.M., MORELL, M.K., JAMES, M.G., BALL, S.G. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. **Plant Physiology**, Bethesda, v.122, p.989-997, 2000.

PAULL, R.E. Pineapple and Papaya. In: SEYMOUR, G.B., TAYLOR, J.E., TUCKER, G.A. **Biochemistry of fruit ripening**. Ed Chapman & Hall, London, p.303–315, 1996.

PENG, M., GAO, M., BAGA, M., HUCL, P., CHIBBAR, R.N. Starch-branching enzymes preferentially associated with A-type starch granules in wheat endosperm. **Plant Physiology**, v.124, p.265-272, 2000.

PETERSON, G.L.A. Simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* Wich is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, Baltimore, v.83, p.346–356, 1977.

PURGATTO, E. **Efeito do ácido indol - 3 acético no metabolismo amido - sacarose durante o amadurecimento da banana (*Musa spp.*)**. São Paulo, 2001, 131p. (Tese de Doutorado Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

PURGATTO, E., LAJOLO, F.M., NASCIMENTO, J.R.O., CORDENUNSI, B.R. Inhibition of β -amilase 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 .do., LAJOLO, F.M., CORDENUNSI, B. R. The onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. **Journal of Plant Physiology**, v.159, p.1105-1111, 2002.
- QIN, Y., WANG, Y., DUAN, C.Q., ZHANG, D.P. β -amylase is predominantly localized to plastids in the developing tuberous root of sweet potato. **Acta Botanica Sinica**, v.45, n.5, p.581-588, 2002.
- RAHMAN, A., WONG, K., JANE, J., MYERS, A., JAMES, M. Characterization of SU1 isoamylase, a determinant of storage starch structure in mayze. **Plant Physiology**, Bethesda, v.117, p.425-435, 1998.
- RITTE, G., LORBERTH, R. , STEUP, M. "Reversible binding of the starch-related RI protein to the surface of transitory starch granules". **The Plant Journal**, v.21, n.4, p.387-391, 2000.
- ROSSETTO, M.R.M. **Efeito do ácido giberélico no metabolismo amido-sacarose durante o amadurecimento da banana (*Musa acuminata* var. Nanicão)**. São Paulo, 2001. 79p. (Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- ROSSETTO, M.R.M., PURGATTO, E., NASCIMENTO, J.R.O.do , LAJOLO, F.M., CORDENUNSI, B.R. Effects of gibberellic acid on sucrose accumulation and sucrose biosynthesizing enzymes activity during banana ripening. **Plant Growth Regulation**, v.41, p.207-214, 2003.
- SIMÃO, S. Tratado de fruticultura. **FEALQ** , Piracicaba, 760 p., 1998.

- SEYMOUR, G.B. Banana. In: Seymour, G.B., Taylor, J.E., Tucker, G.A. **Biochemistry of Fruit Ripening**, London: Chapman & Hall, ed.2, p.83-101, 1996.
- SILVEIRA, M. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: SOUZA, W. (ed.) **Manual sobre técnica básica em microscopia eletrônica**. Sociedade Brasileira de Microscopia eletrônica. Rio de Janeiro, p.71-105, 1989.
- SIVAK, M.N., PREISS, J. Starch degradation. In: Advances in food and nutrition research. **Academic**, San Diego, p.153–162, 1998. [Starch: basic science to biotechnology].
- STITT, M., BULPIN, P.V., REES, T. Pathway of starch breakdown in photosynthetic tissues of *Pisum sativum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.544, p.200-214, 1978.
- SUBRAMANYAM, H.; KRISHNAMURTHY, S.; PARPIA, H.A .B. – Physiology and biochemistry of mango fruit. **Advances in Food Research.**, v.21, p.223-305, 1975.
- TANDON, D.K., KALRA, S. K.- Changes in sugars, starch, and amylases activity during development of mango fruit cv Dashehari. **Journal of Horticultural Science**, Índia, v.58, n.3, p.449-453, 1983.
- THEOLOGIS, A. One rotten apple spoils the whole bushel - The role of ethylene in fruit ripening. **Cell**, Cambridge, v.70, n.2, p.181-184, 1992.
- TREPTOW, R.O., QUEIROZ, M., ANTUNES, P.L. Caracterização físico-química e sensorial de quatro cultivares de maçãs (*Malus domestica* B.). **Agrociência**, Pelotas, v.1, n.3, p.179-184, 1995.

- TUCKER, G.A ., GRIERSON, D. Fruit ripening. In: Daves, D.D., ed. **The Biochemistry of Plants: A comprehensive treatise**. San Diego: Academic Press, v.12, p. 265 - 318, 1984.
- TUCKER, G.A. Introduction. In: SEYMOUR, G.B., TAYLOR, J.E., TUCKER, G.A., eds. **Bichemistry of fruit ripening**. London: Chapman & Hall, 1993. Cap.1, p.1-43.
- VIEIRA JÚNIOR, A. **Seqüência e caracterização molecular do cDNA de uma α -amilase de banana expressa durante o amadurecimento da banana (*Musa spp.*)**. São Paulo, 2001, 88p. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- WANG, Y.Z., ZHANG, D.P. Activities, quantitative changes and subcellular localization of α -amylase during development of apple fruit. **Acta Botanica Sinica**, v.44, n.1, p.34-41, 2003.
- WITT, W., SAUTER, J.J. In vitro degradation of starch grains by phosphorylases and amylases from poplar wood. **Journal Plant Physiology**, Kent, v.146, p.33-40, 1995.
- WONG, D.W.S. Amilolitic Enzymes in **Food Enzymes: Structure an Mechanism**, Chapman and Hall, USA, cap.3, 390p, pp.37, 1995.

8. RESUMO

Dentre as características que definem um fruto maduro, o adoçamento é um dos mais importantes. Porém, no que concerne à manga, os dados existentes são escassos e pouco esclarecedores. Neste trabalho foi estudada a síntese e a degradação do amido da manga 'Keitt', nos aspectos químicos (teores de amido, de amilose e de açúcares solúveis), nos aspectos bioquímicos (atividade de enzimas relacionadas à degradação do amido, perfil de enzimas ligadas ao grânulo de amido) e aspecto morfológico do grânulo de amido (preliminar), e o amadurecimento do fruto. A manga 'Keitt' teve um padrão atípico de fruto climatérico, com a produção de pequenas quantidades de etileno e CO₂, culminando em picos após o processo de amadurecimento ter sido iniciado. Todo o amido acumulado (cerca de 8 %) durante o desenvolvimento até os 3 dias após a colheita (dpc), foi totalmente degradado a partir dos 5 dpc chegando ao final do amadurecimento com apenas traços do seu conteúdo inicial. Ao mesmo tempo acumulou cerca de 10 % de açúcares solúveis, com predominância da sacarose. As enzimas que potencialmente podem degradar o amido, tiveram perfil de atividade compatível com a sua atuação. Houve um aumento bastante significativo de atividade da α -amilase durante a formação do fruto e da β -amilase durante o amadurecimento do fruto. As fosforilases e isoamilases, embora tivessem atividade suficiente para atuar durante a degradação do amido, demonstraram pelo perfil de atividade terem bastante importância durante a síntese do amido. Os grânulos de amido, como observados por microscopia eletrônica de varredura, tem grânulos redondos,

lisos e pequenos (até 20 μm), que diminuem de tamanho durante o amadurecimento da manga. As proteínas ligadas ao grânulo, como visto por eletroforese em condições dissociantes, aumentaram em número e quantidade depois da colheita da manga, mostrando que várias proteínas de alto e baixo peso molecular, aderiram ao grânulo antes do início da degradação.

9. ABSTRACT

Sweetening is one of the most important characteristics concerning ripe fruit. However, physiological and biochemical changes associated to mango fruit ripening process, including mango sweetening, is still poor understood. In this work the synthesis and breakdown of the starch were studied focusing starch, amylose, and soluble sugars content. Also the activities of some enzymes that participate in starch metabolism were evaluated during development and ripening of mango 'Keitt'. Through Scanning Electron Microscopy, granule starch shape and superficial changes related to the degree of mango ripening, were investigated. Results shown that mango fruit (cv. Keitt) has not a typical profile of ethylene and respiration during the ripening process, with very low levels of both parameters. There was a massive conversion of the starch accumulated (~8 %) during fruit development to soluble sugar (~10 %), with a predominance of sucrose. The activity of α -amylase increased at least 20 times during fruit development while β -amylase showed detectable activity after fruit harvesting. Starch-phosphorylases and isoamylases activities can be linked with both starch synthesis and degradation. Granule starch isolated from mango, showed spherical shape and small size (~20 μm) when the mango achieve full starch content (~3 days after harvest), with about 25 % of amylose. During fruit ripening, granule size suffered superficial corrosion and decreased in size (~6 μm). SDS-PAGE gels showed that after harvesting increased the number of starch bounded proteins with low and high molecular weight, inclusive

inside the granule. These proteins can be associated with starch degradation process.