

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Recebido em 02/11/98
Epidia

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

NÃO LER

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS
ÁREA DE BROMATOLOGIA

23272

**METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DURANTE O
AMADURECIMENTO DO MAMÃO (*Carica papaya* L.
cv. Solo): INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA**

MARIA LUIZA PASSANEZI ARAÚJO GOMEZ

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. **BEATRIZ ROSANA CORDENUNSI**

15881
São Paulo
1998

15881
15881-8

DEDALUS - Acervo - CQ



30100001961

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Gomez, Maria Luiza Passanezi Araújo

G633m Metabolismo de carboidratos durante o amadurecimento do mamão
(*Carica papaya* L. cv. Solo) : influência da radiação gama / Maria
Luiza Passanezi Araújo Gomez. -- São Paulo, 1998.
61p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental.

Orientador: Cordenunsi, Beatriz Rosana

1. Mamão : Bioquímica dos alimentos 2. Enzimas : Ciência
dos alimentos 3. Carboidratos : Ciência dos alimentos I. T. II.
Cordenunsi, Beatriz Rosana, orientador.

641.34651 CDD

MARIA LUIZA PASSANEZI ARAÚJO GOMEZ

**METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DURANTE O
AMADURECIMENTO DO MAMÃO (*Carica papaya* L. cv. Solo):
INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA**

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

PRESIDENTE E ORIENTADORA

PROF. DRA. BEATRIZ ROSANA CORDENUNSI

1º EXAMINADOR

PROF. DR. MARCOS BUCKERIDGE

2º EXAMINADOR

PROF. TIT. FRANCO MARIA LAJOLO

São Paulo, 08 de outubro de 1998.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por ter me dado a oportunidade de escolher o caminho da pesquisa, que se mostrou mais gratificante do que eu imaginava.

Gostaria também de agradecer aos meus pais, Antonio e Amélia, às minhas irmãs, Cris e Maris, ao meus avós Octávio e Maria (*in memoriam*), ao S. Jesus e D. Vitória e à minha amiga-irmã Karina, que tanto me incentivaram na realização do mestrado como um passo rumo ao progresso profissional.

Aos colegas de trabalho: Renata, Inés, Lúcia, Ana Paula, Daniela, Eduardo, Willian e Priscila, que me ajudaram muito neste percurso.

À amiga Marisa, que esteve sempre presente, principalmente nos momentos mais difíceis, e cuja ajuda foi essencial para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento, por sua inestimável ajuda em praticamente todos os momentos da realização deste trabalho, além da boa companhia.

Ao Prof. Tit. Franco M. Lajolo, pelos valiosos conselhos oferecidos durante a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Marcos Buckeridge, pelo carinho, atenção e prontidão com que me recebeu, ensinou e auxiliou.

Aos funcionários Ângela, Mônica e Isabel, da Secretaria do Departamento, e Jorge, Elaine e Benê, da Secretaria da Pós-Graduação, pela ajuda e boa-vontade.

Aos demais Professores e colegas do Laboratório e do Departamento, pela colaboração, carinho e amizade.

À bibliotecária Adriana, pela trabalhosa correção das referências bibliográficas.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

E principalmente à minha orientadora, Profª. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi, que me incentivou à pesquisa, auxiliou no trabalho e dispendeu toda a sua paciência e carinho para comigo, sendo amiga e companheira em todos os momentos.

Muito obrigada.

Dedico este trabalho especialmente

**Ao meu pai, Antonio, e minha mãe, Amélia,
pelo incentivo e apoio totalmente incondicionais**

Ao João Manoel, e ao futuro do nosso filho, Arthur.

ÍNDICE:

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. BIOQUÍMICA DO AMADURECIMENTO DE FRUTOS	4
1.1.1. Cor	5
1.1.2. Textura	6
1.1.3. Sabor : aroma	6
1.1.4. Sabor : adoçamento	7
1.1.5. Metabolismo da sacarose.....	8
Sacarose Sintase (EC 2.4.1.13).....	8
Sacarose-Fosfato Sintase (EC 2.4.1.14).....	10
Invertases (EC 3.2.1.26).....	12
1.2 <i>CARICA PAPAYA</i> LINNEU	13
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. FRUTOS	22
3.2. DETERMINAÇÃO DE ETILENO E RESPIRAÇÃO	22
3.3. DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS.....	23
3.3.1. Análise de Amido	23
3.3.2. Açúcares Solúveis	23
3.3.3. Carboidratos da parede celular	24
3.4. EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS SACAROSE SINTASE E SACAROSE-FOSFATO SINTASE.....	25
3.5. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS SACAROSE SINTASE E SACAROSE -FOSFATO SINTASE.....	25
3.6. EXTRAÇÃO DAS INVERTASES	26
3.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS INVERTASES ÁCIDA E NEUTRA	26
3.8. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DAS PROTEASES	26
3.9. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA	27
3.10. ELETROFORESES E WESTERN BLOTTING	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. AMOSTRAGEM PELO SISTEMA DE BATOQUES NO ACOMPANHAMENTO DO AMADURECIMENTO DE MAMÕES	29
4.2. EXTRAÇÃO DA SACAROSE SINTASE E SACAROSE-FOSFATO SINTASE DE MAMÕES.....	29
4.2.1. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO EXTRATORA.....	29
4.2.2. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E DESSALINIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO.....	33

4.3. RESPIRAÇÃO E PRODUÇÃO DE ETILENO DURANTE O AMADURECIMENTO DE MAMÕES IRRADIADOS E NÃO-IRRADIADOS	36
4.4. TEORES DE CARBOIDRATOS DURANTE O AMADURECIMENTO DE MAMÕES IRRADIADOS E NÃO-IRRADIADOS.....	37
4.4.1. AMIDO	37
4.4.2. AÇÚCARES SOLÚVEIS	38
4.4.3. AÇÚCARES DE PAREDE CELULAR.....	41
4.5. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DURANTE O AMADURECIMENTO DO MAMÃO	44
4.5.1. SACAROSE SINTASE, SACAROSE-FOSFATO SINTASE.....	44
4.5.2. INVERTASES NEUTRA E ÁCIDA.....	49
5. CONCLUSÕES	51
6. BIBLIOGRAFIA	52
7. RESUMO	60
8. ABSTRACT	61

Lista das Figuras:

Figura 1:	Anatomia do mamão mostrando a localização da placenta e dos feixes dorsais e marginais.....	14
Figura 2:	Fluxograma do procedimento utilizado na extração dos polissacarídeos de parede celular de mamão.....	24
Figura 3:	Atividade de proteases em extrato bruto de mamão verde utilizando-se diferentes inibidores de proteases.....	31
Figura 4:	Respiração e produção de etileno durante o amadurecimento de mamões irradiados e não-irradiados.....	36
Figura 5:	Metabolismo dos açúcares solúveis de mamões irradiados e não-irradiados durante o amadurecimento.....	39
Figura 6:	Comportamento de glicose e galactose provenientes dos açúcares de parede celular de mamões em três estágios de amadurecimento.....	42
Figura 7:	Metabolismo da D-galactose em vegetais superiores.....	44
Figura 8:	Atividade de SS e SPS em mamões irradiados e não-irradiados durante o amadurecimento.....	45
Figura 9:	Perfil eletroforético das proteínas do extrato bruto de mamões não-irradiados (5 DPC), extraídas pelo método modificado.....	47
Figura 10:	Western Blotting das proteínas do extrato bruto de mamões não-irradiados (5 DPC), extraídas pelo método modificado.....	48
Figura 11:	Atividade das invertases neutra e ácida em mamões irradiados e não-irradiados durante o amadurecimento.....	49

Lista das Tabelas:

Tabela 1:	Atividades de SS e SPS utilizando-se diferentes antioxidantes na solução extratora.....	30
Tabela 2:	Atividade de SPS utilizando-se diferentes concentrações de NaCl na solução extratora.....	30
Tabela 3:	Atividade de SPS utilizando-se diferentes inibidores de proteases na solução extratora.....	32
Tabela 4:	Teores de amido durante o amadurecimento de mamões irradiados e não-irradiados.....	38
Tabela 5:	Conteúdo de açúcares neutros dos polissacarídeos solúveis em água, da parede celular de mamões irradiados e não-irradiados durante o amadurecimento.....	42
Tabela 6:	Porcentagens de galactose livre em três estágios de amadurecimento de mamões irradiados e não-irradiados.....	43

1. INTRODUÇÃO

Frutas e hortaliças são alimentos essenciais na dieta humana, devido ao aporte significativo de minerais, vitaminas, carboidratos e fibras. Esse valor nutritivo pode ser influenciado pela natureza do produto, sofrendo modificações devido a razões genéticas, condições de desenvolvimento do cultivo, estado de maturação do fruto no momento da colheita e manejo pós-colheita (Arias, 1998).

O maior componente dos frutos é a água que, juntamente com carboidratos, proteínas, ácidos orgânicos e outras substâncias, dá origem a produtos com características sensoriais muito peculiares. Este alto teor de água é um fator determinante para o seu consumo, pois confere uma turgência e frescor que são altamente apreciados pelos consumidores. Entretanto, esta mesma característica dificulta sua conservação e, uma vez separados os frutos da planta mãe, ficam mais suscetíveis ao murchamento ou apodrecimento, pois vão perdendo parcialmente a umidade por ação do meio ambiente, tornando-se substratos para numerosos microorganismos que os transformam e deterioram (Arias, 1998).

A deterioração pós-colheita de frutos é um grave problema que resulta em grandes perdas econômicas para os produtores, comerciantes e consumidores. No Brasil, as perdas em cidades bem estruturadas, como Curitiba, por exemplo, chegam a 30%, enquanto que na Europa não ultrapassam os 10%. Isto poderia ser minimizado pelo planejamento da produção, levando em conta a demanda dos consumidores, adequando a infraestrutura e tecnologias pós-colheita dos sistemas de produção e distribuição dos produtos, e melhorando a informação dos comerciantes e dos canais de comercialização, bem como da conservação por parte dos consumidores. A qualidade pós-colheita pode ser melhorada verificando-se as condições de plantio e desenvolvimento das plantas ainda no campo, pois esses fatores irão determinar a infecção ou resistência dos frutos aos patógenos (Umaña-Rojas, 1998; Arias, 1998). Ao mesmo tempo, as tecnologias pós-colheita são imprescindíveis para se manter a qualidade e propriedades nutricionais de frutos, e acabam por selecionar as variedades

que melhor se adaptam ao meio ambiente, com maior resistência a enfermidades, maior produtividade e demanda pelos consumidores. Deve-se levar em consideração, entretanto, que a utilização destas tecnologias irá elevar o preço dos frutos; deve-se ponderar se esse aumento será aceito pelo consumidor, havendo retorno do investimento.

Entre as tecnologias pós-colheita que podem ser utilizadas para o controle fitossanitário e aumento de vida útil de frutas e hortaliças, temos tratamentos químicos e físicos. A utilização de substâncias químicas é altamente eficiente na prevenção à infestação dos frutos mas, devido a problemas relacionados à saúde, meio-ambiente e segurança dos trabalhadores, tem sido proibido o seu uso na Europa e EUA (Saucedo-Velóz, 1997).

Entre os tratamentos físicos temos a utilização de altas temperaturas nos tratamentos de desinfestação dos frutos, de baixas temperaturas para retardar a senescência e aumentar a vida pós-colheita e de radiação ionizante que visa tanto desinfestar quanto aumentar a vida-de-prateleira do fruto.

Altas temperaturas ($\approx 40^{\circ}\text{C}$) são eficazes no tratamento da quarentena de frutos, mas podem alterar sua fisiologia de forma ainda desconhecida, ou levar a uma aceleração indesejada do amadurecimento. O armazenamento de frutos a baixas temperaturas ($0-3^{\circ}\text{C}$) é bastante eficiente, porém frutos tropicais, particularmente, não são adequados este procedimento, podendo sofrer injúrias ocasionadas pelo frio (“chilling injury”), muitas vezes tornando-se inaceitáveis para o consumo.

A utilização de radiação ionizante é comprovadamente eficaz tanto na desinfestação (doses de 0,5 a 1,0 kGy) como no prolongamento da vida útil dos frutos (doses de 0,25 a 0,5 kGy) e, em comparação a outros métodos, resulta em frutos com maior qualidade. Além disso, não deixa resíduos indesejáveis nos alimentos e garante penetração uniforme, atingindo todas as etapas do desenvolvimento dos insetos (Iaderoza *et al.*, 1988; Paull, 1994; Thomas *et al.*, 1986). As principais limitações do uso da irradiação de alimentos são o alto custo da

implantação das instalações apropriadas, e o preconceito que ainda existe por parte dos consumidores em relação aos alimentos irradiados, apesar de existir, desde 1970, a aprovação de entidades como a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Internacional de Energia Atômica (OIEA) aos alimentos irradiados (Prieto-Miranda, 1997).

Já existem tecnologias para a prevenção do apodrecimento parcial de tomates, morangos e figos através da irradiação, e para retardar o amadurecimento de bananas, mangas, mamões, cerejas, limão goiaba, abacate, maçã e apricot (Murray, 1990; Prieto-Miranda, 1997). As conclusões sobre a adequação de um dado fruto à irradiação devem primeiro ser formuladas com bases em cada cultivar. Em uvas, limões, pêssegos e nectarinas, ocorre uma aceleração do desenvolvimento das cores de amadurecimento, associada à diminuição do potencial de armazenamento. Pesquisas feitas com mamões indicam que a irradiação pode levar a alterações da sua textura, cor e adoçamento (Iaderoza *et al.*, 1988), mas em geral, leva a um retardo do amadurecimento desejável do ponto de vista econômico, aumentando sua vida de prateleira (D'Innocenzo, 1996; Zhao, 1996). Este benefício, entretanto, só é obtido quando o fruto for irradiado com menos de 30% de amarelamento da casca, e com doses inferiores a 1kGy.

Se o fruto não estiver no estágio adequado de maturação fisiológica, ou já tiver iniciado o seu amadurecimento, ou ainda se forem aplicadas doses inadequadas de radiação, o tratamento pode não funcionar, não retardando o amadurecimento, ou promovendo mudanças indesejadas na cor e sabor. É sabido que a aplicação de radiação gama (5 kGy) em pêras pré-climatéricas aumenta em 250% a taxa respiratória; se o fruto for submetido à irradiação durante o período climatérico, esse aumento é de apenas 25% (Awad, 1993). Existem também frutos intolerantes à irradiação, como por exemplo a manga que, quando verde, e se irradiada com apenas 0,1 kGy, deixa de amadurecer. A radiação também danifica as membranas celulares, através de peroxidação dos lipídeos, deixando-as frágeis (Murray, 1990; Awad, 1993). A manutenção da integridade da membrana ao redor das células da polpa do fruto, e entre os diferentes compartimentos subcelulares dentro destas células, é

essencial para a coordenação do processo de amadurecimento. Isto normalmente envolve a liberação controlada de fósforo inorgânico (Pi), armazenado nos vacúolos. Este Pi pode ativar fosfofrutoquinases e então aumentar o fornecimento de substratos para a respiração na mitocôndria, como ocorre, por exemplo, em tomates. A liberação repentina e descontrolada de Pi pelas células danificadas, pode contribuir para o aumento imediato que ocorre na respiração de frutos irradiados. Esse aumento na respiração pode não ser devido à liberação de etileno, que está aumentada em frutos irradiados, já que essa resposta ocorre mesmo após muitos dias, e mesmo porque os frutos irradiados perdem a capacidade de responder ao etileno com aumento da taxa de respiração (Murray,1990).

A irradiação em altas doses pode produzir um amolecimento da polpa que é diferente, do ponto de vista qualitativo, do amolecimento natural. Ao invés da quebra seletiva da pectina e celulose da parede celular, mediada por pectinametilesterases, poligalacturonases e celulases, a irradiação leva a uma quebra das ligações glicosídicas em todos os polissacarídeos da parede celular, em todas as partes do fruto, levando ao amolecimento indiscriminado (Murray,1990; Awad, 1993). Como consequência dos danos à membranas semipermeáveis e à parede celular, os frutos irradiados por altas doses são mais suscetíveis a injúrias causadas por choques mecânicos, vibração, esmagamento e machucados durante o manuseio e transporte. O recurso para evitar que os frutos sejam expostos a altas doses de radiação é a utilização conjunta de outros métodos de controle fitossanitário, como tratamentos térmicos ou uso de fungicidas (Saucedo-Velóz, 1997).

1.1. BIOQUÍMICA DO AMADURECIMENTO DE FRUTOS

Durante o amadurecimento dos frutos, mudanças genotípicas-dependentes podem ocorrer no número de células, no seu tamanho, pigmentação, aroma, estrutura da parede celular, conteúdo de ácidos orgânicos, açúcares, vitaminas e minerais envolvidos, parâmetros estes que se encontram intimamente regulados e coordenados em todo o fruto. O etileno tem um papel estimulante do metabolismo em geral e pode

estar envolvido na ativação ou regulação de enzimas existentes, de estágios do amadurecimento, como também na expressão de novos genes. O aumento rápido da respiração em frutos climatéricos é associado à produção de etileno, e um acréscimo similar da taxa respiratória pode ser induzido submetendo frutos climatéricos ou não ao gás. Outra evidência do papel regulatório do etileno é que frutos verdes amadurecem mais rapidamente se o gás é aplicado externamente (Mc Glasson *et al.*, 1978) e também que, removendo-se o etileno de acordo com a sua produção e submetendo o fruto à baixa pressão, o amadurecimento é retardado (Tucker e Grierson, 1987). Em muitos cultivares, o etileno dispara o pico climatérico, associado à maior síntese de enzimas-chaves, responsáveis pela catálise de reações bioquímicas que conferem as mudanças visíveis e não visíveis envolvidas no amadurecimento (Murray, 1990). A caracterização das mudanças que ocorrem durante o amadurecimento é essencial para o estudo das suas propriedades nutricionais (Camara *et al.*, 1996) e para o melhoramento de frutos, visando, sobretudo, maior qualidade. Entre as mudanças mais importantes associadas ao amadurecimento dos frutos, estão as mudanças de cor da casca e da polpa, de textura da polpa e do sabor do fruto.

1.1.1. Cor

Os frutos normalmente apresentam a cor verde no início do seu desenvolvimento. Mudanças na cor da casca e da polpa indicam, muitas vezes, o estágio de amadurecimento do fruto. Essas mudanças são luz-dependentes e envolvem pigmentos como clorofila, carotenóides e antocianinas. As clorofilas se encontram nos cloroplastos, associados a carotenóides, que são precursores da vitamina A. As antocianinas são glicosídeos de certos compostos fenólicos, geralmente encontrados nos vacúolos das células. Durante o amadurecimento ocorre síntese de pigmentos associada à degradação da clorofila, que encobre alguns outros pigmentos preexistentes, sendo que estes passam a ser notados (Awad, 1993; Paull, 1996).

1.1.2. Textura

O amolecimento da polpa é um processo típico do amadurecimento de frutos, podendo ser atribuído a três mecanismos: perda de turgência, degradação do amido, e degradação da parede celular. A perda de umidade pode tornar o fruto comercialmente inaceitável; a degradação de amido resulta em pronunciada modificação de textura em frutos que possuem grandes quantidades de amido a serem degradadas durante o amadurecimento, como a banana, por exemplo. Mas na maioria dos frutos, a mudança mais importante em relação à textura é a degradação da parede celular. Acredita-se que a estrutura mais afetada durante o amadurecimento seja a lamela média, rica em polissacarídeos. A parede celular é constituída por duas fases (ou matrizes): uma microfibrilar, composta pela celulose, e outra microcristalina, composta por pectinas, hemiceluloses, proteínas e compostos fenólicos (Brett & Waldron, 1990). É na parte protéica da parede (2-10%) composta por glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, que são encontradas as enzimas. Estas podem ser peroxidases, invertases, pectinametilerases, poligalacturonases, pectinases, celulasas, entre outras. Os polissacarídeos (celulose, hemicelulose e pectina) perfazem 90 a 95% dos componentes estruturais da parede celular, e mudanças aparentes no tamanho molecular destes polímeros durante o amadurecimento implicam na ação das enzimas capazes de degradar componentes específicos, sendo que cada enzima vai promover a quebra de uma ligação ou tipo de ligação em particular. Geralmente, é necessária a ação conjunta de várias enzimas para que haja a hidrólise total dos polímeros (D'Innocenzo, 1996).

1.1.3. Sabor : aroma

A percepção do aroma no homem se dá através de dois sentidos: o olfato e a gustação. Em frutos, a maior contribuição para o aroma é dada por açúcares e ácidos orgânicos, bem como pela presença de taninos e compostos fenólicos, enquanto que o aroma característico de cada fruto é derivado de compostos voláteis específicos, e depende de uma complexa interação entre todos estes componentes (Paull, 1996). É bastante evidente a variação no conteúdo dos componentes do aroma de frutos, mas a

característica de cada fruto é mantida durante o amadurecimento. Alguns compostos podem se sobrepor a outros, como por exemplo em mamões, onde a produção do linalool aumenta cerca de 400 vezes, enquanto a produção do benzil isotiocianato aumenta apenas 7 vezes (Flath *et al.*, 1990 citado por Paull, 1996). Outros componentes do sabor têm sua quantidade diminuída durante o amadurecimento. É o caso dos compostos fenólicos, que provavelmente têm função protetora dos frutos quando verdes, e que causam adstringência no sabor. Com o amadurecimento, o teor destes compostos decresce consideravelmente, como é o caso da polpa do mamão maduro, que apresenta teores de compostos fenólicos quatro vezes menor que no fruto recém colhido (Tan & Lam, 1985).

1.1.4. Sabor : adoçamento

O adoçamento está entre as principais transformações bioquímicas que ocorrem durante o amadurecimento dos frutos. A mobilização de carboidratos de reserva na forma de amido, ou de sacarose proveniente da planta, levando ao acúmulo de açúcares, contribui para a obtenção deste importante atributo de qualidade dos frutos.

A banana é um bom modelo para o estudo do metabolismo de carboidratos em frutos climatéricos que contêm amido de reserva para ser degradado durante o amadurecimento. O amido armazenado é reduzido durante o climatério, de teores próximos de 21% a menos de 1%, enquanto o teor de sacarose aumenta aproximadamente 12 vezes, podendo chegar a 15%, precedendo o aparecimento de hexoses (Arêas e Lajolo, 1981).

Em frutos não-climatéricos, como a laranja, a sacarose presente se origina nas folhas, como resultado da fixação do carbono pela fotossíntese, podendo ser utilizada na formação de compostos precursores da parede celular durante o período de expansão do fruto, ou ser acumulada, resultando no adoçamento do fruto. Compreende-se assim porque o fruto não-climatérico deve ser colhido já pronto para o consumo, uma vez que o processo de adoçamento não se desenvolve após a

colheita, a não ser em proporções muito pequenas, resultante da degradação parcial da parede celular (Akazawa e Okamoto, 1980; Hawker, 1985; Salunke *et al.*, 1991).

1.1.5. Metabolismo da sacarose

A sacarose é o açúcar solúvel predominante na maioria dos frutos maduros, sendo a principal forma pela qual o carbono é translocado e, usualmente, o primeiro produto da fotossíntese. Alguns frutos maduros (banana, maçã, kiwi) apresentam sacarose como resultado da hidrólise do amido durante o amadurecimento; outros, como frutas cítricas e uvas, como consequência do acúmulo durante o desenvolvimento.

As enzimas sacarose sintase (SS), sacarose-fosfato sintase (SPS), e invertases estão diretamente envolvidas na síntese/degradação da sacarose nos vegetais superiores (Salerno e Pontis, 1977).

Sacarose Sintase (EC 2.4.1.13)

A sacarose sintase (SS) catalisa a reação:



onde n podem ser nucleotídeos como uridina, adenosina, timidina, citosina, ou guanosidina (Wolosiuk & Pontis, 1974). A reação possui constante de equilíbrio que pode variar de 1 a 8, o que indica sua natureza reversível (Pontis, 1979).

Especula-se que possam haver duas isoenzimas da SS, cada uma catalizando a reação em um dos sentidos, hidrólise ou síntese da sacarose (Wolosiuk & Pontis, 1971; Gross & Pharr, 1982). Trabalhos mais recentes, realizados com milho, parecem confirmar essa hipótese, demonstrando que os genes codificadores para cada uma das isoformas são diferentes entre si (Taliércio & Chorney, 1989; Heilein & Starling, 1989; Koch *et al.*, 1992, citados por Bendazzoli, 1995). Entretanto, esta hipótese ainda não está totalmente elucidada, merecendo mais estudos a respeito.

Estudos realizados com banana (Cordenunsi, 1989; Cordenunsi e Lajolo, 1995; Nascimento *et al.*, 1997) demonstraram que a atividade da SS é alta durante o período de acúmulo de amido no fruto (até cerca de 100 dias após a antese), decaindo posteriormente, durante o amadurecimento, quando há hidrólise do amido, possivelmente por uma diminuição na síntese protéica da SS (Geigenberger & Stitt, 1993; Bendazzoli, 1995). Isto indica que, neste caso, a SS deve estar envolvida na hidrólise da sacarose formada via fotossíntese, para fornecimento de nucleotídeos precursores da síntese do amido (como UDP-Glicose, por exemplo) e da formação de glicolípides, glicoproteínas e polissacarídeos. O mesmo tipo de resultado foi obtido em grãos de arroz, onde Chan *et al.* (1990) observaram que a SS apresenta maior atividade específica durante a fase inicial do desenvolvimento, período de intenso acúmulo de amido. Isto reforça a idéia de que a enzima seria importante para dar suporte ao crescimento da planta, provendo os nucleotídeos necessários para a síntese dos diversos compostos essenciais para o desenvolvimento. Resultados semelhantes foram verificados em batatas (Pressey, 1970; Geigenberger & Stitt, 1993; Murata, 1972), melões (Lingle & Dunlap, 1987), tomates (Dali *et al.*, 1992 citado por Mota, 1997) e pêssegos (Vizzotto *et al.*, 1992). O fornecimento dos nucleotídeos pela SS é feito através de transglicosidases ligadas à membrana, responsáveis pela síntese daqueles compostos, com excessão do amido (Brett & Waldron, 1990; Hawker, 1985).

O metabolismo de carboidratos envolve diversas etapas bioquímicas e diferentes enzimas, variando muito entre os vegetais estudados. Além da SS, outras enzimas presentes neste metabolismo são a ADP-glicose-pirofosforilase, envolvida na síntese de amido, as invertases catalizadoras da hidrólise irreversível da sacarose, e sacarose-fosfato sintase (SPS), que participa da síntese da sacarose. Como, geralmente, todas essas enzimas estão presentes simultaneamente nos tecidos vegetais, tem sido difícil descartar o envolvimento da SS na síntese da sacarose. Em peras, por exemplo, parece haver um comportamento diferente da SS. Moriguchi *et al.* (1992), analisaram o metabolismo de açúcares em dois cultivares de peras, sendo um com grande acúmulo de açúcares no estágio maduro (Chojuro), e outro com

baixo acúmulo (Yali). Os resultados demonstraram que nas peras Chojuro as atividades de SS e SPS aumentavam concomitantemente com o período de acúmulo de sacarose, o que não acontecia nas peras Yali. Entretanto, enquanto a atividade da SS parecia estar fortemente relacionada a este acúmulo, a atividade da SPS parecia não estar relacionada.

Após purificação e caracterização parciais da SS, Bendazzoli (1995) observou que a enzima, em bananas, apresenta peso molecular de aproximadamente 490 kD, e subunidades de 100 kD, valores próximos aos encontrados na literatura para outras fontes.

Sacarose-Fosfato Sintase (EC 2.4.1.14)

A SPS está diretamente relacionada à síntese de sacarose, a partir de UDP-glicose e frutose-6-fosfato (F6P), tendo como produto de reação a sacarose 6-fosfato. A enzima se mostrou muito importante no controle da partição do carbono entre amido e sacarose (Stitt *et al.*, 1987). Ao contrário da reação catalisada pela SS, neste caso a reação de formação da sacarose é praticamente irreversível, devido à imediata desfosforilação da sacarose-6-fosfato por uma sacarose-fosfato fosfatase (Hawker, 1985). Além disso, ao contrário da SS, o único nucleotídeo operante nesta reação é a Uridina-DP-glicose.

O mecanismo de ação da SPS é sequencial, com a enzima inicialmente se complexando com a UDP-glicose e, posteriormente, à F6P (Salerno & Pontis, 1977; Hawker, 1985). A regulação da atividade da SPS parece ser feita pela ativação/inibição por parte de metabólitos, ou por modificação covalente do sítio alostérico, via fosforilação reversível. Estudos com fósforo marcado (Huber *et al.*, 1989) sugeriram a existência de uma proteína-quinase que fosforila a SPS, inativando-a. Entretanto, essa inibição parece ser revertida por glicose-6-fosfato (G6P). Weiner *et al.* (1992) confirmaram a existência de uma proteína-fosfatase, inibida por Pi e insensível a G6P, que faria a ativação da SPS *in vivo*, em folhas de espinafre. Desta forma, a G-6P parece ativar a SPS, aumentando sua afinidade por

F6P e, conseqüentemente, sua velocidade de reação, sendo que esta ativação é antagonizada pela presença de Pi. A atividade da SPS pode ainda ser regulada por alterações nos níveis da proteína SPS. Este controle serviria principalmente para regular as variações metabólicas, em tecidos fotossintetizantes, impostas pelo ciclo claro-escuro.

Apesar de a maioria dos estudos terem sido realizados tendo em vista a regulação da atividade da enzima relacionada ao ciclo claro-escuro, os mesmos mecanismos de controle podem ser propostos para tecidos não-fotossintetizantes, como os frutos. Por exemplo, em kiwi (MacRae *et al.*, 1992) e banana (Hubbard *et al.*, 1990) foram observados aumentos no estado de regulação, sugerindo o mesmo mecanismo que é encontrado em tecidos fotossintetizantes. Em bananas, entretanto, este mecanismo de regulação parece não ser tão importante quanto o aumento na expressão da proteína SPS (Nascimento, 1997).

Em frutos, o acúmulo de sacarose leva a uma ativação da SPS e inibição das invertases, como foi verificado em melões (Lingle & Dunlap, 1987), tomates (Miron & Schaffer, 1990), pêssegos e morangos (Hubbard *et al.*, 1990). Em bananas (Cordenunsi, 1989; Hubbard *et al.*, 1990), mangas (Hubbard *et al.*, 1990) e kiwi (MacRae *et al.*, 1992), parece existir uma estreita relação entre o acúmulo da sacarose e a hidrólise do amido.

A enzima nativa provavelmente existe como dímero ou tetrâmero, com subunidades de peso molecular variando entre 116 e 138 kD. Apesar de a enzima ser bastante conservada entre diferentes fontes vegetais (Nascimento, 1997), parecem haver diferenças significativas quanto aos mecanismos de regulação da sua atividade nos diversos sistemas onde ocorre síntese de sacarose. Estudos com a enzima purificada se fazem necessários para verificar as propriedades da SPS de diferentes fontes vegetais, bem como a forma como a enzima está envolvida na regulação da síntese da sacarose nos vegetais superiores, principalmente em frutos.

Invertases (EC 3.2.1.26)

As invertases catalisam a hidrólise da sacarose a frutose e glicose e podem ser classificadas em ácida ou neutra, dependendo do seu pH ótimo de atividade e de sua localização. Essa hidrólise é irreversível, pois envolve a quebra da ligação glicosídica. A invertase ácida (pH ótimo = 5,0) apresenta sua atividade máxima nos tecidos em desenvolvimento, com rápido crescimento celular, encontrando-se nos vacúolos, onde hidrolizam a sacarose estocada ou recém translocada para produção de hexoses, utilizadas na respiração e síntese da parede celular. As invertases neutras (pH ótimo = 7,5) encontram-se preferencialmente no citoplasma (Hawker, 1985).

Estudos realizados com cana-de-açúcar (Hatch e Glasziou, 1963) demonstraram que a invertase ácida, que está presente no tecido de reserva imaturo, é substituída pela invertase neutra no tecido de reserva maturo. Estes resultados são semelhantes aos obtidos em cítricos (Kato e Kaboto, 1978) e melões (Lingle & Dunlap, 1987), com a única diferença de, nestes casos, ser detectada a atividade da invertase neutra em tecidos imaturos, também.

Estudos feitos com pimenta demonstraram que as atividades das invertases neutra e ácida aumentam no decorrer do amadurecimento, acarretando o acúmulo de hexoses no final deste período (Hubbard & Pharr, 1992). Em manga, entretanto, a atividade da invertase ácida parece ter um pico no início do amadurecimento, seguido de decaimento contínuo. Neste caso, não ocorre acúmulo de hexoses, mas sim de sacarose, sendo que a atividade de SPS acompanha este acúmulo (Castrillo *et al.*, 1992). Em caquis, foi observado que a atividade das invertases é alta, apesar de se encontrar grandes quantidades de sacarose. Isto se tornaria possível devido à diferente compartimentalização de enzima e substrato, sendo que a invertase se encontraria ligada à parede. Desta forma, não haveria hidrólise da sacarose endógena, mas sim da exógena, facilitando sua absorção (Iwatsubo *et al.*, 1992).

Em mamões, Chan & Kwok (1975) demonstraram que a alta atividade das invertases pode influenciar os resultados do conteúdo de açúcares solúveis, levando a conclusões equivocadas. Pal & Selvaraj (1987), também trabalhando com mamões,

observaram que, na fase de mudança da coloração da casca (135 dias após a antese - dpa), a atividade das invertases aumenta cerca de 30 vezes até o período final do amadurecimento (150 dpa). Este resultado está de acordo com os teores de açúcares solúveis obtidos por Chan *et al.* (1979), os quais verificaram que, na fase final do amadurecimento de mamões, o conteúdo de sacarose decai proporcionalmente ao aumento nos teores de glicose e frutose, indicando hidrólise da primeira.

O acúmulo de sacarose em frutos pode ser resultante tanto do aumento na atividade de enzimas sintetizantes (SPS, por exemplo), como da diminuição da atividade de enzimas hidrolíticas (invertases, por exemplo), ou ainda de ambos os processos. Lingle & Dunlap (1987) observaram elevadas atividades das invertases ácida e neutra e baixa atividade de SPS em frutos jovens de melão, onde os únicos açúcares solúveis detectados eram glicose e frutose. Com o amadurecimento do fruto, a atividade das invertases eram diminuídas, e a da SPS aumentada, assim como o conteúdo de sacarose. Em frutos maduros de pêsego, entretanto, a atividade da SPS permanece constante durante o período de amadurecimento, sugerindo que o acúmulo da sacarose seja devido preferencialmente à inativação das enzimas hidrolíticas a ativação das enzimas sintetizantes (Vizzotto *et al.*, 1996).

1.2 *CARICA PAPAYA* LINNEU

O mamão é uma planta originária das Américas Central e do Sul, sendo que seu cultivo se estende entre zonas tropicais e subtropicais. Existem 4 gêneros e 31 espécies de mamões, com cromossomos $2n=18$. O fruto pode ser usado para produção de sucos, geléias, frutas cristalizadas, frutas em conserva, e seu látex é utilizado como amaciante de carnes (Umaña-Rojas, 1998; Paull, 1996).

O fruto, de formato redondo ou cilíndrico, pode medir de 5 a 40 cm, e pesar até 5 kg. O formato depende das flores originárias, hermafroditas ou pistiladas. O tipo Solo, mais comum, é originado de flores hermafroditas e tem formato de pêra ou cilíndrico (Paull, 1996). O fruto (Figura 1) é normalmente composto por cinco

carpelos longitudinais unidos lateralmente, com a polpa circundando uma cavidade central com 5 ângulos, onde numerosas sementes estão ligadas à placenta em posição parietal. As sementes maduras se apresentam cinza escuro ou pretas, e são envoltas individualmente por uma sarcotesta. A polpa comestível (1,5 a 4,0 cm de espessura) varia de branco no fruto imaturo a amarelo ou vermelho no fruto maduro. A casca é fina e frágil, variando de verde ou amarelo esverdeado a alaranjado quando o fruto está maduro (Paull, 1996).

O desenvolvimento do fruto desde a polinização até o amadurecimento leva cerca de 173 dias quando cultivado a 30°C dia/ 20°C noite, e cerca de 282 dias se cultivado a 24°C dia/ 12°C noite (Paull, 1996). Quando se inicia o período de maturação, é necessário manejo cuidadoso pois, sendo fruta climatérica, é muito suscetível à rápida deterioração, que pode afetar tanto a qualidade como a quantidade da colheita (Umaña-Rojas, 1998).

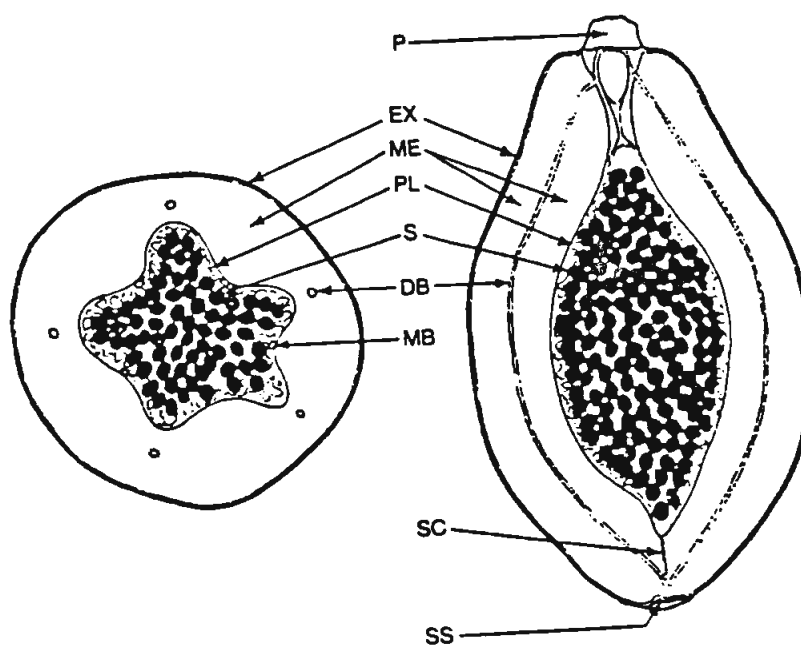


Figura 1. Anatomia do mamão mostrando a localização da placenta e dos feixes dorsais e marginais. P: pedúnculo; EX: exocarpo; ME: mesocarpo; PL: placenta; DB: feixes dorsais; MB: feixes marginais; S: sementes; SC: canal do estigma; SS: cicatriz do estigma. Fonte: Paull, 1996.

A colheita nunca é realizada antes da “quebra” da coloração verde da casca, ou seja, quando aparecem as primeiras colorações amareladas (“pintas”). É sabido que mamões colhidos tardiamente são mais susceptíveis a enfermidades. O ponto de colheita ideal é quando o fruto tem um mínimo de 10% de casca amarela (2 a 3 “pintas”). A temperatura ótima de amadurecimento é de 22,5 °C a 27,5 °C, levando de 10 a 18 dias para atingir o grau máximo de amarelamento da casca. O amadurecimento varia com o cultivar, e pode levar de 7 a 16 dias (Paull, 1996).

As principais causas de perdas na colheita do mamão são as enfermidades que se desenvolvem no campo e na pós-colheita. Essas perdas variam entre 1 e 93% da produção, dependendo do manejo e embalagem empregados (Alvarez & Nishijima, 1987). A podridão que ataca o mamão pode ser veiculada por patógenos que infectam o fruto verde, intacto e imaturo, iniciando a infecção nos estágios iniciais de desenvolvimento, sendo que o microorganismo permanece latente até que os tecidos do fruto alcancem a fase climatérica, ou por patógenos que infectam o fruto através de feridas ocorridas durante ou após a colheita. A enfermidade mais importante é a antracnose veiculada por *Colletotrichum goeosporioides*, pois tem ótimo desenvolvimento nas condições tropicais.

Do ponto de vista fisiológico, o mamão é um fruto climatérico (Selvaraj *et al.*, 1982); desta forma, a curva respiratória apresenta um período pré-climatérico extenso, seguido de um pico climatérico bem definido. Frutos colhidos com mudanças na coloração da casca já passaram por esse período pré-climatérico. O aumento da produção de etileno parece acompanhar o aumento da respiração, atingindo em conjunto o ponto máximo (Paull & Chen, 1983). O estudo em diferentes tecidos demonstrou maior atividade das enzimas formadoras de etileno (EFE) no exocarpo de frutos 75% maduros (Chan *et al.*, 1990). Como o fruto amadurece de dentro para fora, a atividade das EFE nos tecidos placentários decai, aumentando nos feixes dorsais até atingir um pico, quando, a partir daí, os níveis de EFE permanecem constantes até o fruto atingir a senescência (Paull & Chen, 1983).

Durante o amadurecimento, encontra-se na cavidade cerca de 16% de CO₂ e 0,5% O₂ (Wardlaw & Leonard, 1938, citados por Paull, 1996). O tipo Solo apresenta de 3 a 6% de CO₂ (Akamine & Goo, 1979; Paull & Chen, 1983). As quantidades de DNA e RNA sofrem pequena variação durante o amadurecimento, e o conteúdo de proteína aumenta na fase pré-climatérica, declinando durante o amadurecimento (Pal & Selvaraj, 1987).

A quantidade de ácidos orgânicos tituláveis decai com o crescimento do fruto levando o pH de 5,0 a 5,5 (Paull, 1996). O ácido ascórbico compõe cerca de 18% dos ácidos totais, sendo que 67% são compostos por ácidos málico, cítrico e α -cetoglutárico, e os 8% restantes, por ácidos voláteis (Selvaraj *et al.*, 1982). A acidez titulável pode aumentar levemente durante o amadurecimento, o que pode estar parcialmente associado ao aumento do ácido galacturônico livre (Paull, 1996; D'Innocenzo, 1996). Há também um pequeno aumento na concentração de ácidos orgânicos isolados. A concentração de ácido ascórbico aumenta 4 vezes durante o amadurecimento (Paull, 1996).

Quanto aos pigmentos, há diferenças entre frutos com polpa vermelha e amarela. Nos frutos com polpa vermelha, 63,5% dos carotenóides é composto por licopeno, inexistente em frutos amarelos. O mamão verde tem 16 vezes mais clorofila que o maduro (Birth, 1984). Com o amadurecimento, a clorofila é degradada, e carotenóides são sintetizados, aumentando em cerca de 14 vezes seu conteúdo total. Outros carotenóides encontrados no mamão são: β -caroteno, δ -caroteno, criptoxantina e monoepóxido de criptoxantina (Paull, 1996).

A análise dos compostos voláteis do mamão por cromatografia gasosa identificou mais de 200 componentes responsáveis pelo aroma, entre álcoois, aldeídos, ésteres, hidrocarbonetos, cetonas e compostos heteroatômicos, como, por exemplo, o benzil-isotiocianato. O conteúdo destes componentes varia com o local, com o cultivar do fruto e com o estágio de amadurecimento. Quanto ao teor de compostos fenólicos, é sabido que decai 4 vezes do ponto de colheita até o fruto maduro (Paull, 1996).

O látex do mamão, presente em folhas, pecíolos, caule e nos frutos verdes é rico em proteases, como por exemplo, a papaína, quimopapaínas A e B, e peptidase A do mamão. A função destas proteases é ainda desconhecida, mas parece estar ligada à defesa contra a ação de insetos e fungos durante o desenvolvimento do fruto, já que a atividade proteásica no mamão decai com o amadurecimento, sendo indetectável no fruto maduro (Paull, 1996).

Quanto à textura, o mamão atinge um estágio comestível entre 6 e 12 dias após a colheita, se colhido no momento da “quebra” da coloração verde. O conteúdo de pectinas solúveis em água decai rapidamente quando o fruto atinge 70-80% de amarelamento da casca, sendo que as pectinas solúveis em ácido permanecem inalteradas. Alguns autores descrevem um pequeno aumento na quantidade de polissacarídeos solúveis em álcali durante o amadurecimento (Paull, 1996). Ocorre também uma degradação dos polissacarídeos solúveis em água a açúcares solúveis em etanol. D’Innocenzo (1996), estudando as atividades das enzimas de hidrólise da parede celular no decorrer do amadurecimento de mamões irradiados e não irradiados, verificou que as atividades de poligalacturonase (PG), celulase, β -galactosidase e pectinometilesterase (PME) aumentaram no fruto durante o amadurecimento, independente de este ter sido irradiado ou não. Estes resultados estão de acordo com Lazan *et al.* (1995), que, ao estudar as enzimas pectolíticas de mamões não-irradiados, verificou um aumento uniforme da PG e PME, enquanto que a β -galactosidase apresentava duas velocidades de reação, lenta no início e rápida no final do amadurecimento. As diferenças entre as atividades das enzimas de mamões irradiados e controle ocorrem em termos de velocidade de reação e início da ativação destas. As enzimas PG, PME e β -galactosidase apresentam diferenças entre os tratamentos nos mesmos períodos onde ocorrem mudanças na textura do fruto. Através destes resultados, a autora chegou à conclusão de que a hidrólise da pectina está mais relacionada ao amolecimento do fruto que a hidrólise da celulose, uma vez que a atividade da celulase não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Lazan *et al.*(1995), entretanto, concluiu que a despolimerização e solubilização da pectina são processos independentes, sendo que a solubilização deve

ocorrer anteriormente à despolimerização. Desta forma, os caminhos que levam ao amolecimento, tanto em mamões quanto em outros frutos, permanecem desconhecidos, havendo somente hipóteses, que continuam sendo estudadas.

Quanto aos carboidratos solúveis, sabe-se que nos estágios iniciais de desenvolvimento do fruto, há um predomínio de glicose entre os açúcares. A partir dos 110 dias após a antese (dpa), quando a polpa e sementes iniciam a mudança de coloração, ocorre uma modificação deste perfil (Chan *et al.*, 1979; Selvaraj *et al.*, 1982). Segundo Chan *et al.* (1979), em frutos ligados à árvore, a sacarose varia de 1,8% aos 110 dpa a 8,0% aos 135 dpa, possivelmente devido à fixação de sacarose via fotossíntese. Já Paull (1996) demonstrou a presença de 1,5 a 2,0% de açúcares solúveis no fruto recém-colhido, chegando a 11,5% no fruto maduro, o que indica que existe síntese e acúmulo destes açúcares no fruto após a colheita.

Segundo Chan *et al.* (1979) e Selvaraj *et al.* (1982) o conteúdo de amido varia de 0,5 % no fruto verde a 0,1% no fruto maduro. Foi encontrada alguma atividade amilásica em frutos verdes, com pico de atividade entre 80 e 110 dpa, e alguns grânulos de amido foram encontrados, através de análise por microscopia eletrônica, próximos à epiderme de frutos verdes (Sanxter, 1990 citado por Paull, 1996). Das enzimas envolvidas no metabolismo da sacarose (SS, SPS e invertases), existem estudos principalmente com as invertases, que, sabe-se, aumenta de 2 (Hubbard *et al.*, 1991) a 15 vezes (Chan & Kwok, 1976) durante o amadurecimento do mamão. Lopez *et al.* (1988), após purificação e caracterização parcial das invertases do mamão, determinaram que, à semelhança do que ocorre com a invertase de cana-de-açúcar, há uma inibição da enzima por frutose, via mecanismos de competição, indicando que há dois sítios de reação. Outros estudos (Chan & Kwok, 1975; Pal & Selvaraj, 1987; Chan, 1979) analisam e demonstram bem o comportamento das invertases no mamão. Entretanto, as atividades da SS e SPS não são bem estudadas. É sabido que ocorre uma conversão entre os carboidratos, mas os passos metabólicos envolvidos permanecem desconhecidos.

Sobre o processamento pós-colheita de mamões, a irradiação com doses de até 1,0 kGy não têm efeito deletério sobre papaias (Balock *et al.*,1966). Ao contrário, doses de 0,5 a 1,0 kGy (dose ótima de 0,75 kGy, segundo Paull, 1994), são capazes de diminuir a despolimerização das frações pécticas, aumentando a vida pós-colheita de mamões em 2 a 3 dias (D’Innocenzo, 1996; Zhao *et al.*,1996). Ao termos em vista que o mamão necessita de 6 a 12 dias para atingir a textura desejada, percebemos que esta contenção no amadurecimento compõe 30 a 50% de prolongamento na vida de prateleira do fruto.

1.3. EXTRAÇÃO DE ENZIMAS DE VEGETAIS

Muito do nosso conhecimento sobre a biologia molecular de estrutura e função enzimáticas foi adquirido de estudos de enzimas isoladas, purificadas até a homogeneidade. Estes estudos estabeleceram que muitas enzimas são compostas por subunidades, que podem estar associadas com suas funções catalíticas ou regulatórias. Também foi relatada a existência de múltiplas formas moleculares (isoenzimas), que podem ser determinadas por diferentes genes ou serem resultantes de modificações secundárias da enzima durante a extração.

Os problemas relativos ao isolamento de enzimas em plantas incluem tanto problemas gerais de estabilidade das enzimas, como problemas particulares devidos à presença de compostos fenólicos e taninos, além de outras enzimas que podem competir pelo substrato ou originar interações indesejáveis, que devem ser considerados como os de maior importância na aplicação de alguns dos procedimentos clássicos em proteínas vegetais. As condições sob as quais os tecidos são homogeneizados têm um papel crucial no sucesso da extração de uma enzima. Saber, ou ter uma idéia da localização da enzima na estrutura celular pode indicar a melhor forma de homogeneização e extração, variando-se o procedimento. A composição do meio de extração usado, bem como do meio reacional, é um fator importante e, sob circunstâncias desfavoráveis, como por exemplo pH inadequado ou presença de compostos inibitórios, pode levar a um extrato com baixa ou nenhuma

atividade enzimática (Rhodes, 1977), induzindo a conclusões errôneas. Enfim, a otimização da composição dos meios extrator e de reação está diretamente relacionada ao sucesso na determinação da atividade de uma enzima e para posterior purificação e caracterização da mesma.

2. OBJETIVOS

Neste trabalho tivemos como objetivos específicos verificar:

- (1) se existe síntese de açúcares solúveis após a colheita do mamão;
- (2) se as enzimas SS, SPS e invertases têm atividade durante este período e se há correlação com o metabolismo da sacarose;
- (3) se a irradiação gama afeta estas enzimas e o adoçamento do mamão durante o seu amadurecimento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. FRUTOS

Mamões (*Carica papaya* L. cv. Solo), fisiologicamente maduros, foram obtidos na Central de Abastecimento de São Paulo (CEASA), a partir de frutos que apresentassem somente uma pinta amarela na casca. Cerca de 72h após a colheita, 8 frutos foram irradiados com 0,5 kGy, na Empresa Brasileira de Irradiação (EMBRARAD) e o mesmo número de frutos não irradiados foram utilizados como controle.

Foi realizado um experimento envolvendo a utilização de um sistema onde se pudesse acompanhar as mudanças bioquímicas sempre no mesmo fruto, feito através da amostragem por batoques, que consistem de cilindros transversais com cerca de 5 cm de diâmetro, retirados da porção equatorial do fruto, com o auxílio de um furador de rolhas. Para este experimento, os frutos foram mantidos em câmaras com temperatura controlada (cerca de 18°C) até o completo amadurecimento e amostrados diariamente, retirando-se um batoque por dia, sendo o furo resultante vedado com parafina comum. Para evitar contaminações, o local da incisão foi previamente higienizado com solução de hipoclorito de sódio a 5% e o furador de rolha utilizado para retirar o batoque foi esterilizado por flambagem. Não foi necessário o uso de câmara asséptica. As amostras assim obtidas foram imediatamente fatiadas e congeladas em nitrogênio líquido, e armazenadas em freezer a -80° C até o momento da análise.

3.2. DETERMINAÇÃO DE ETILENO E RESPIRAÇÃO

A produção de CO₂ e etileno foram determinadas diariamente. Os frutos foram colocados em frascos fechados e, após exatamente uma hora, amostras do ar do interior de cada frasco foram retiradas com seringas hipodérmicas de 1 mL. As análises foram feitas por cromatografia a gás, utilizando coluna Porapack Q, e

detector de ionizador de chama. Como padrão, foi utilizada uma mistura de ar sintético contendo 300 ppm de etileno. A respiração foi medida quantificando o CO₂ produzido por frutos, mantidos em frascos fechados e conectados a um analisador de gases por infravermelho (Analytical Development Co.). A leitura foi feita após dez minutos, quando a circulação do ar foi considerada estabilizada. O ponto zero da escala do aparelho foi estabelecido com o ar ambiente, livre de umidade e de CO₂, através de passagem por colunas de sílica gel e de cal sodada. Como padrão foi utilizado ar sintético com 350 ppm de CO₂.

3.3. DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS

3.3.1. Análise de Amido

A análise do amido foi realizada após extração dos açúcares solúveis, através de incubação da amostra com α -amilase termoresistente a 100°C, gelatinização com KOH 7M em gelo e hidrólise a 37°C com amiloglicosidase, sendo a glicose formada determinada pelo sistema glicose-oxidase/peroxidase/ABTS, de acordo com Champ (1992). A modo de comparação, testou-se o método otimizado por Arêas e Lajolo (1981) para determinação de amido em frutos, onde o amido é solubilizado com álcali, precipitado com etanol e hidrolisado com amiloglicosidase. A glicose resultante é dosada pelo sistema Glicose-Oxidase/Peroxidase/ABTS. Também foi testada extração do amido com DMSO, foi utilizado o método descrito por Carpita & Kanabus (1987).

3.3.2. Açúcares Solúveis

Os açúcares solúveis foram extraídos com etanol 80% a 80°C. Para isso, homogeneizou-se 0,5g da amostra com 3 mL de etanol 80%. O homogenato foi mantido sob agitação mecânica a 80°C por 20 minutos e centrifugado a 17.000g por 30 minutos. Este procedimento foi repetido por três vezes, os sobrenadantes reunidos em balão volumétrico e seu volume acertado com etanol 80%. Posteriormente, o etanol de 1mL da amostra foi evaporado em rotaevaporador ou speedvac a 43°C, e os

sólidos solúveis retomados em água. A determinação de glicose e frutose foi feita pelo método enzimático segundo o sistema hexoquinase / glicose 6-fosfato desidrogenase / fosfoglicose isomerase, medindo-se a redução de NADP a 340 nm. A sacarose foi previamente hidrolisada por invertase durante 30 minutos e a glicose formada foi determinada da mesma maneira. (Bergmeyer,1974).

3.3.3. Carboidratos da parede celular

Amostras de mamão (*Carica papaya* L. cv. Solo) em três estágios de amadurecimento (verde - 3 DPC, intermediário - 6 DPC e maduro - 10 DPC) foram liofilizadas e submetidas ao seguinte procedimento da Figura 2 (os itens sobretachados foram descartados):

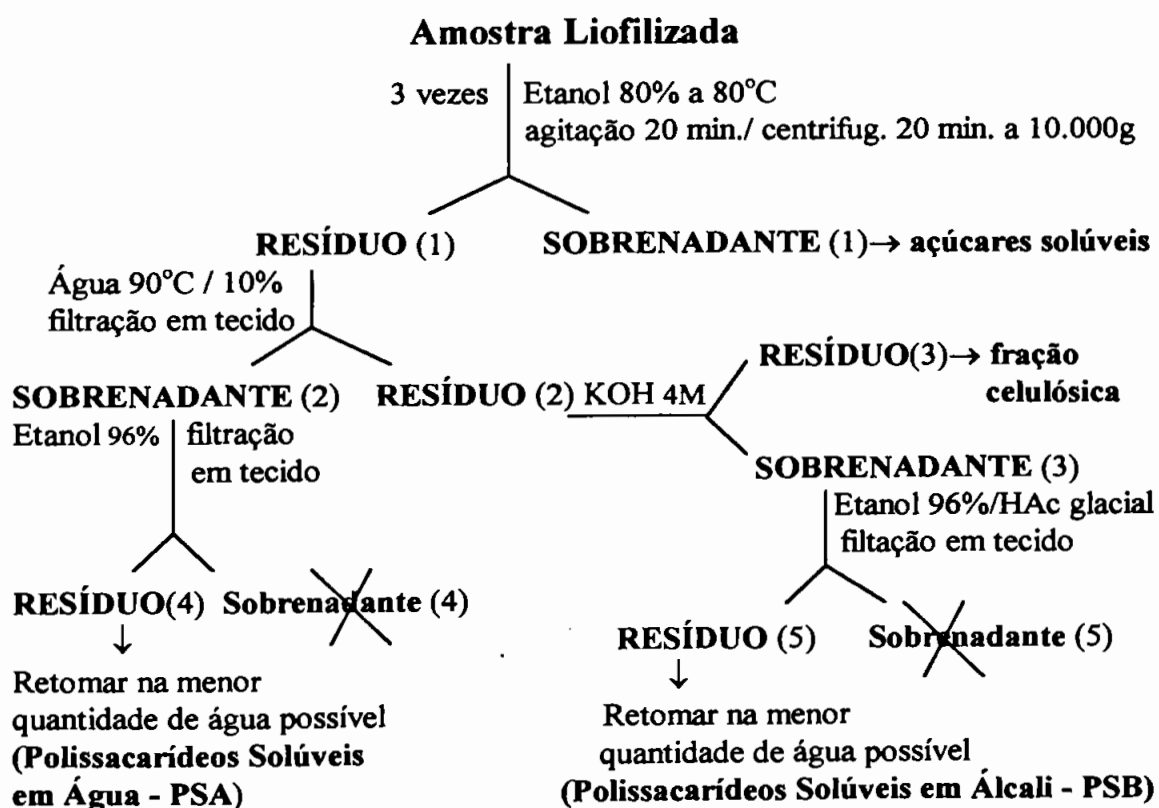


Figura 2. Fluxograma do procedimento utilizado para extração dos polissacarídeos da parede celular de mamões irradiados e não-irradiados.

Os polissacarídeos solúveis em água (PSA) e os solúveis em KOH (PSB) foram hidrolisados com ácido sulfúrico 72%, autoclavados por 1 hora, e neutralizados com NaOH grau HPLC. Os teores dos açúcares resultantes foram determinados por HPLC, acoplado a detector de pulso amperométrico (PAD).

3.4. EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS SACAROSE-FOSFATO SINTASE E SACAROSE SINTASE

Cerca de 1g de polpa de mamão, previamente pulverizada com nitrogênio líquido, foi homogeneizada, com 1 mL de solução extratora em Potter, por 1 min, em banho de gelo. A solução extratora foi constituída por Tris-HCl 500mM, pH 7,5, contendo EDTA 40mM, ácido ascórbico 50mM, glicerol 15% (v/v) e NaCl 1M. O extrato foi centrifugado por 20 minutos a 20.000g e o sobrenadante dialisado através de coluna Sephadex G-25 HiTrap Desalting (Pharmacia). As frações que continham maior quantidade de proteína e menor quantidade de açúcares solúveis foram as utilizadas para medir a atividade das enzimas.

3.5. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS SACAROSE-FOSFATO SINTASE E SACAROSE SINTASE

A atividade da SPS foi determinada em meio saturante composto por 60 μ L de HEPES-KOH 95mM pH 7,5 contendo frutose-6P 20mM, UDPG 20mM, cloreto de magnésio 30mM e 40 μ L do extrato enzimático dialisado. A mistura foi incubada por 20 minutos a 37°C e a reação foi interrompida pela adição de 200 μ L de NaOH 1M. A sacarose formada foi determinada pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA) descrito por Percheron (1962). A atividade da SS foi determinada da mesma maneira sendo o meio de atividade composto por Tris-HCl 54mM pH 7,5, contendo frutose 20mM, UDPG 20mM e cloreto de magnésio 30mM.

3.6. EXTRAÇÃO DAS INVERTASES

As amostras foram homogeneizadas em Potter com solução extratora, composta por tampão fosfato 50mM pH 7,5 contendo NaCl 50mM; Glicerol 5%; MnSO₄ 5 μ M; β -Mercaptoetanol 1mM, na proporção de 1g/1mL durante 1 minuto. O extrato foi centrifugado a 20.000g durante 10 minutos e o sobrenadante foi dessalinizado em coluna Sephadex G-25 HiTrap Desalting. A fração que apresentou maior quantidade de proteína e menor quantidade de açúcares foi utilizada para as análises de atividade das invertases.

3.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS INVERTASES ÁCIDA E NEUTRA

A 20 μ L do extrato enzimático foram adicionados 20 μ L de sacarose 0,6 M, 60 μ L de tampão de NaOAc 0,2M, pH 4,6, contendo 0,01% de albumina e completando o volume até 200 μ L com água purificada. Esta mistura foi incubada a 30°C durante 10 minutos e a reação cessada por fervura do extrato por 1 minuto. A glicose resultante da atividade da enzima foi medida através do sistema Glicose-oxidase/Peroxidase/ABTS (Bergmeyer, 1974), utilizando glicose como padrão. A atividade da invertase neutra foi doseada da mesma maneira somente substituindo-se o tampão NaOAc 0,2M, pH 4,6 por tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7,0.

3.8. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DAS PROTEASES

A atividade de proteases foi determinada após hidrólise protéica da caseína seguida de leitura da absorbância a 280nm. O extrato bruto do mamão foi incubado a 37°C com uma solução 0,5% de caseína em tampão Tris-HCl 20mM pH 7,5; alíquotas do meio foram retiradas a cada 10 minutos, tendo a reação interrompida com adição de ácido perclórico 1,8M, deixadas em repouso por exatamente 30 minutos e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. A proteína hidrolisada contida no sobrenadante foi determinada por leitura em espectrofotômetro a 280nm. Como branco de reação, foram submetidas ao mesmo procedimento uma incubação do extrato de mamão com o tampão Tris-HCl 20mM pH 7,5 sem caseína, e uma

incubação da solução de caseína com o tampão de extração puro. O resultado é dado pelo valor obtido da amostra subtraindo-se os valores obtidos dos brancos.

3.9. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

Para a quantificação da proteína nos extratos enzimáticos, empregou-se o método de Bradford (1976) que consistiu na adição de 200 μ L de reagente de Bradford (Bio-Rad) e 950 μ L de água a 50 μ L da amostra e leitura da absorbância a 595nm. Como padrão foi utilizada albumina de soro bovino.

3.10. ELETROFORESES E WESTERN BLOTTING

As eletroforeses realizadas foram conduzidas em condições dissociantes segundo Laemmli (1970). As amostras previamente pulverizadas com nitrogênio líquido foram imediatamente homogeneizadas com tampão de Laemmli adicionado de β -mercaptoetanol e levados à fervura por 10 minutos. A seguir, foi feita uma precipitação das proteínas presentes com ácido tricloroacético (TCA) em concentração final para 12%. Os precipitados formados foram lavados sucessivamente com uma solução éter/ clorofórmio/ etanol em proporção 1:2:1, com acetona pura e com éter. Após total evaporação do éter, os precipitados foram ressuspensos no menor volume possível do tampão de Laemmli adicionado de glicerol e β -mercaptoetanol. Foi utilizado gel de separação contendo 7,5% de acrilamida, e a corrida foi realizada durante 45 minutos com voltagem fixada em 300V. A revelação das bandas de separação foi feita com solução de Comassie Blue-R. Foi testada a extração de proteínas segundo Dominguez-Puigjaner *et al.*(1992), que consiste da extração das proteínas da amostra pulverizada em nitrogênio líquido por meio de tampão Tris-HCl 0,25M pH 8,4, contendo glicina 0,2M, SDS 0,4% (p/v) e β -mercaptoetanol 10% (v/v). O extrato foi homogeneizado em Turrax, centrifugado a 12.000 g por 20 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante tratado com fenol equilibrado com tampão Tris-HCl 1M pH 8,0. Após recuperação e lavagens da fase fenólica e interfase com Tampão Tris-HCl 10mM pH 7,5 contendo EDTA 1mM, foram

adicionados 4 volumes de solução de acetato de amônio 0,2M em metanol, deixando-se precipitar “overnight” a -20°C. O sistema foi centrifugado a 12.000 g por 20 minutos, e o precipitado seco foi retomado no menor volume possível de tampão de Laemmli para aplicação em gel de eletroforese dissociante. O teor de proteínas do extrato foi determinado através do método de Lowry *et al.*(1951) modificado por Peterson (1977). O terceiro método de extração de proteínas para aplicação em gel de eletroforese consistiu em homogeneização da amostra pulverizada em N₂ líquido com tampão de extração das enzimas SS e SPS (ver item 3.4), e seguindo-se o protocolo da precipitação com TCA.

O Western blotting foi realizado contra anti-corpos anti-SS e anti-SPS de bananas, utilizando-se IgG de cabra anti-coelho associada a fosfatase alcalina para detecção. A partir da separação das proteínas por eletroforese dissociante, foi feita transferência para duas membranas de nitrocelulose em tampão Tris-glicina pH 8,3, sendo que a transferência se deu em voltagem fixada (30 V) e conduzida “overnight” a 4°C. Cada membrana foi bloqueada com solução contendo 5% de leite desnatado, e incubada com a mesma solução contendo antisoro anti-SS e anti-SPS separadamente, ambos na diluição 1:500, durante 2 horas, sob agitação. Após a incubação, as membranas foram lavadas diversas vezes com tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5 contendo NaCl 150mM. Em seguida, as membranas foram novamente incubadas com anticorpos anti-IgG de coelho conjugados com fosfatase alcalina, em diluição 1:1000, também por 2 horas sob agitação. Após novas lavagens, a revelação foi realizada por tampão para fosfatase alcalina contendo 150 µg/mL de NBT (azul de p-nitro-tetrazolio) e 75µg/mL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato), sendo a reação interrompida por adição de EDTA 0,5M pH 8,0, e as bandas de reconhecimento apresentando-se negras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. AMOSTRAGEM PELO SISTEMA DE BATOQUES NO ACOMPANHAMENTO DO AMADURECIMENTO DE MAMÕES

A colheita do mamão é feita baseada na coloração da casca, sem nenhum outro critério mais objetivo, resultando em frutos muito diferenciados um do outro quanto ao estágio de maturação. Em experimentos realizados com o intuito de acompanhar o amadurecimento de mamões, notou-se que estes amadureciam em tempos diferentes, sendo necessárias várias repetições para se obter resultados com baixa variabilidade entre amostras. Assim, tornou-se necessário otimizar um método que amostrasse sempre os mesmos frutos ao longo do amadurecimento, minimizando o problema da heterogeneidade das amostras. Este sistema, como descrito em Material e Métodos (item 3.1, página 19), se mostrou perfeitamente viável, já que os frutos amadureceram em tempos praticamente normais, apresentando a produção de etileno esperada, e não afetando a respiração (ver item Determinação da Respiração e Produção de Etileno a seguir), o que indica que o estresse causado pelas incisões não reduziram significativamente a vida útil dos frutos. Não foi notado o desenvolvimento de cores ou odores estranhos, em relação a frutos que amadureceram inteiros. Desta forma, o sistema de batoques mostrou ser um ótimo meio de se acompanhar o amadurecimento de mamões (podendo ser estendido a outros frutos) minimizando os erros ocasionados pelas diferenças de amadurecimento entre frutos.

4.2. EXTRAÇÃO DA SACAROSE SINTASE E SACAROSE-FOSFATO SINTASE DE MAMÕES

4.2.1. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO EXTRATORA

A princípio, foi testado o procedimento de extração das enzimas utilizado para a banana, segundo Cordenunsi (1989). A partir dos resultados obtidos, foram feitas as modificações necessárias para a otimização da extração das enzimas do mamão. Estes ensaios foram realizados com frutos adquiridos no mercado local.

As primeiras modificações foram feitas na composição da solução extratora, comparando-se Tris-HCl e Hepes-NaOH em diferentes pH (7,0; 7,5; 8,0), diferentes antioxidantes (cisteína, ácido ascórbico e β -mercaptoetanol), e necessidade do uso de complexante de compostos fenólicos (polivinilpirrolidona - PVP). O tampão Tris-HCl (pH 7,5) foi o que forneceu melhores resultados, já que ao se utilizar HEPES-NaOH (pH 7,5), as atividades da SS e SPS obtidas foram mais baixas.

Na comparação entre antioxidantes, o ácido ascórbico (20mM) foi mais eficaz que a cisteína e que o β -mercaptoetanol, normalmente utilizado na extração de enzimas em vegetais (Tabela 1). Já que as proteases encontradas no mamão são, na sua maioria, cisteíno-proteases, concluímos que a cisteína no meio de atividade poderia estar ativando-as (McKee & Smith, 1986; North, 1989; Buttle *et al.*, 1990).

Tabela 1. Atividades (em μmol sacarose/h/g p.f.) de SS e SPS utilizando diferentes antioxidantes na solução extatora.

Antioxidante	SS	SPS
cisteína (20mM)	0,63	0,16
ácido ascórbico (20mM)	2,09	1,04
β -mercaptoetanol (1mM)	-	-

Verificamos, também, que o acréscimo de NaCl à solução extratora, resultou em um aumento de cerca de 4,7 vezes na atividade da SPS. Apesar de serem enzimas citossólicas, é possível que, durante o procedimento, as enzimas se ligassem à parede celular, o que dificultava sua extração (Hawker, 1985). Foram feitas comparações entre diferentes molaridades (0,5M; 1,0M e 1,5M), e os melhores resultados foram obtidos com NaCl 1M (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade da SPS (em μmol sacarose/h/g p.f.) utilizando diferentes concentrações de NaCl na solução extratora.

Concentração de NaCl	SPS
controle	0,9
0,5M	2,4
1,0M	4,8
1,5M	4,2

Ainda em relação ao meio inicial, o uso de complexante de compostos fenólicos (PVP) pôde ser abolido, uma vez que não houve diferenças de atividade entre meios contendo ou não PVP.

Também foram testados diferentes tipos de inibidores de proteases no meio de extração: inibidores diretos, como benzamidina e fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF) (inibidor irreversível de cisteíno-proteases), ambos na concentração de 1mM, e inibidores estéricos competitivos, como albumina de soro bovino e caseína, na concentração de 0,5% (p/v) (Beynon, 1995). A albumina de soro bovina se liga a ácidos graxos livres, protegendo enzimas ligadas à membrana dos ataques proteolíticos (Rhodes, 1977). A atividade de proteases nos extratos foi verificada seguindo-se a hidrólise protéica da caseína através de absorbância a 280nm. Os resultados podem ser vistos na Figura 3:

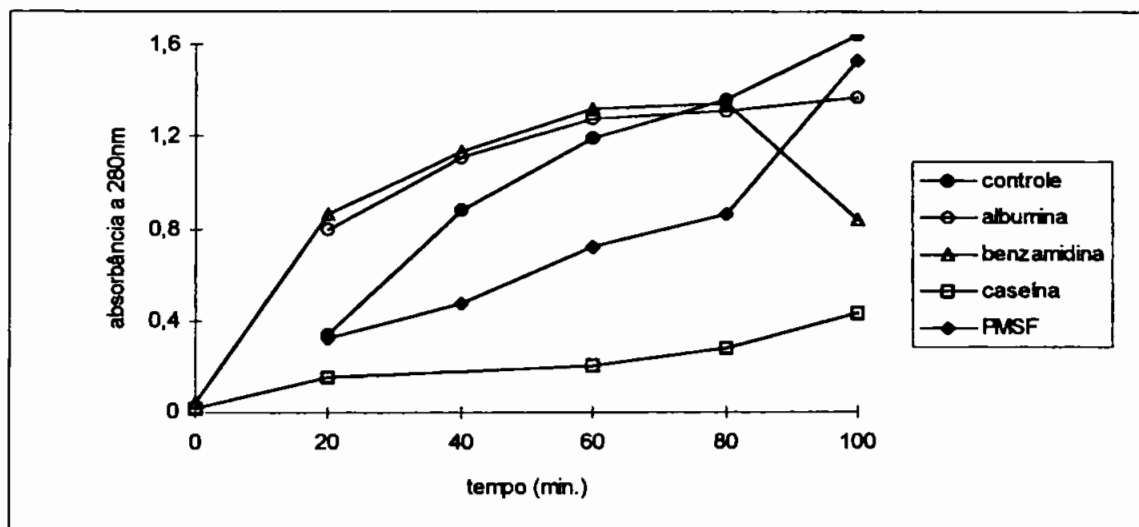


Figura 3. Atividade de proteases em extrato bruto de mamão verde, utilizando diferentes inibidores. A absorbância apresentada já teve descontados os brancos. Cada ponto está representado por média de duplicata de extração e triplicata de análise.

Dentre os compostos utilizados, apenas o PMSF e a caseína tiveram efeito significativo. Parece haver, em relação ao controle, uma ativação das proteases quando se utiliza albumina de soro bovino e benzamidina. Entretanto, as atividades de SS e SPS também sofreram interferência dos inibidores de proteases: a atividade de

SPS foi, em relação aos extratos onde não se utilizou nenhum tipo de inibidor, 0,61, 0,55 e 0,87 vezes menores com a utilização de benzamidina, PMSF e albumina de soro bovino, respectivamente (Tabela 3). A utilização de caseína possibilitou a obtenção de extratos onde a atividade da SPS foi cerca de 60% maior do que a do extrato controle, resultados que estão de acordo com Wallace (1975 - citado por Rhodes, 1977), que verificou que a adição de 3% de caseína no meio de extração aumentou a atividade de uma enzima extraída do milho. Apesar destes benefícios, não foi adotado o uso da caseína pois havia interferência na determinação do teor de proteínas extraídas, e na dessalinização com a coluna Sephadex G-25. A adição de proteínas inertes pode ser de grande valor na determinação quantitativa das atividades de diversas enzimas, mas apresenta o inconveniente de prejudicar a purificação destas. Nascimento *et al.* (1997) verificou, através de eletroforeses em condições nativas, a atuação dos mesmos inibidores em extratos de banana, e verificou que o PMSF não confere proteção eficaz, além de inibir a SPS, talvez por inibição da fosfatase que ativa a SPS. Pela literatura, verifica-se que o PMSF é um inibidor utilizado em quase todos os experimentos envolvendo extratos vegetais, mas temos verificado que, em geral, este exerce um efeito inibidor das enzimas SS e SPS, além de PG e PME, entre outras, no caso de frutos (D’Innocenzo, 1996; Nascimento *et al.*, 1997; Mota, 1997).

Tabela 3. Atividades (em μmol sacarose/ h/ g mamão(p.f.)) da SPS utilizando-se diferentes inibidores de proteases

INIBIDOR	Atividade da SPS
nenhum	0,84
albumina de soro bovina 0,5 % (p/v)	0,73
benzamidina 1 mM	0,51
caseína 0,5 % (p/v)	1,49
PMSF 1 mM	0,46

North (1989), descreve uma solução extratora que utiliza ácido ascórbico como inibidor de proteases. Como a solução extratora otimizada por nós já incluía ácido ascórbico, procuramos somente atingir a concentração indicada pelo autor (50mM); para isso, foi preciso adequar a concentração do tampão Tris-HCL, que

aumentou para 500mM. Desta forma, a solução ótima para a extração e determinação da atividade da SS e SPS em mamões foi composta por Tris-HCl 500mM, EDTA 40mM, ácido ascórbico 50mM, glicerol 15% (v/v) e NaCl 1M. Os resultados demonstram que o tampão modificado é bem mais eficiente, sendo que as atividades da SS e da SPS foram aumentadas 2,6 e 2,9 vezes respectivamente, em relação ao tampão com menor quantidade de ácido ascórbico.

4.2.2. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E DESSALINIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO

O modo de extração também foi otimizado, verificando a atuação de diferentes tipos de homogeneização, como o uso de Potter, Turrax e agitação mecânica. A agitação mecânica foi descartada pois requeria muito tempo (20 a 30 minutos) para que fosse eficiente, o que tornava a extração demorada. A utilização de Turrax foi também descartada por resultar em extratos com baixas atividades de SS e SPS. A homogeneização com Potter foi a mais eficaz, tanto em termos de tempo quanto em termos de rendimento.

A diálise do extrato é um passo fundamental para o sucesso da determinação das atividades da SS e SPS, uma vez que os açúcares solúveis presentes interferem na determinação da sacarose formada pelas enzimas após a incubação, e, quando em excesso, pode funcionar como um inibidor tipo “feed back”. Foram testados quatro tipos de dessalinização: (1) com coluna Sephadex G-25 montada no laboratório, procedimento que não foi eficiente, já que os extratos ficavam muito diluídos, as enzimas perdiam atividade e a separação açúcar/proteína não era bem definida; (2) por ultrafiltração com Centriprep (50 kD), também inadequado, pois, devido à alta quantidade de pectinas solúveis presentes no extrato de mamão, a membrana filtrante era impregnada facilmente, impedindo o andamento do processo; (3) por membrana de diálise, que, embora mais demorada que os demais métodos, era o procedimento mais adequado às nossas condições, por não diluir a amostra, mas sendo pouco eficiente em retirar os açúcares, e (4) com dessalinização por mini-colunas Sephadex G-25 HiTrap Desalting (Pharmacia). Estas colunas, com 5mL de resina Sephadex G-25 superfina, possuem uma faixa de exclusão de 1 a 5 kD, e permitem fluxo rápido

(de 1 a 15 mL/min, ótimo 10 mL/min) do extrato, através de seringa ou bomba peristáltica. O uso destas colunas mostrou-se adequado aos nossos extratos após uma ligeira adaptação do volume de amostra aplicado. O fabricante sugere a aplicação de 1,0 mL de extrato, mas, no nosso caso, devido à grande quantidade de açúcares solúveis presentes, o volume ótimo de aplicação da amostra foi de 0,25 mL da amostra + 1 mL de tampão, seguido por fracionamento com diversas aplicações de 1,0 mL de tampão. Assim, apesar da diluição do extrato (em pelo menos 4 vezes), pela rapidez e eficiência da separação entre proteínas e açúcares, foi adotado o uso das colunas HiTrap nas nossas determinações de atividade. Uma vantagem adicional deste sistema é permitir a determinação de atividade das enzimas em, no máximo, 2 horas após a extração, dificultando, dessa forma, a ação de proteases no extrato.

4.2.3. COMPOSIÇÃO DO MEIO DE ATIVIDADE PARA SS E SPS

O meio de reação para determinação de atividade de SS e SPS de mamão foi o mesmo utilizado para SPS da banana (Cordenunsi, 1989), com modificações apenas nas concentrações dos componentes. O meio original era composto por HEPES-KOH (pH 7,5) 50mM, contendo NaF 1mM, frutose 6-fosfato 5mM, UDPG 10mM, cloreto de magnésio 15mM, e glicose 6-fosfato 15mM. No meio para SPS de mamão, o meio foi composto por HEPES-KOH (pH 7,5) 80mM, contendo NaF 1mM, frutose 6-fosfato 15mM, UDPG 15mM, cloreto de magnésio 30mM, e ausência de glicose 6-fosfato. No caso da SS, o meio de incubação original era composto por Tris-HCl 100mM pH 7,5, contendo NaF 1mM, frutose 10mM, UDPG 5mM, e cloreto de magnésio 15mM. O meio utilizado para SS de mamão foi composto por Tris-HCl 70mM pH 7,5, contendo NaF 1mM, frutose 20mM, UDPG 20mM, e cloreto de magnésio 30mM.

A presença de íons magnésio é capaz de ativar a SS e SPS de extratos brutos (Huber, 1983; Harbron *et al.*, 1981, citados por Hawker, 1985). Este efeito benéfico parece ser conferido por um mecanismo de quelação de compostos inibitórios, uma vez que não se verifica ativação da SPS purificada de folha de espinafre (Harbron *et al.*, 1981, citados por Hawker, 1985). Foram testados diferentes concentrações de

magnésio (10, 20 e 30 mM) no meio de atividade, e os resultados demonstraram que as atividades de ambas as enzimas aumentaram cerca de duas a três vezes quando utilizamos 30mM de cloreto de magnésio, o dobro da concentração utilizada no meio original.

O uso de inibidores de proteases no meio de atividade foi testado, uma vez que a temperatura de incubação (37°C) é ideal para a ação destas enzimas. Verificamos a ação de albumina no meio de atividade, mas os resultados apresentaram-se muito semelhantes aos obtidos com o meio convencional, não justificando seu uso. O uso de caseína novamente resultou em atividades maiores de ambas as enzimas, mas o procedimento torna-se inadequado, uma vez que a caseína não é totalmente solúvel no meio de atividade e a centrifugação do meio de incubação antes do uso pareceu anular o efeito protetor conferido pela caseína.

A SPS de folhas de espinafre é ativada por G-6-P, que atua inibindo a SPS-quinase, enzima que inativa a SPS, por fosforilação (Stitt *et al.*, 1978). Em laranjas-lima que se desenvolveram em meios contendo 40mM de G-6-P, as atividades de SPS apresentaram-se 3 vezes maiores em relação ao controle (Vu *et al.*, 1995). A SPS de bananas parece também ser ativada por G-6-P (Nascimento *et al.*, 1997), mas no caso de SPS de mamões, isso parece não acontecer, pois em todos os experimentos realizados, a adição de G-6-P levou à diminuição da atividade da SPS. Assim, pode ser que a SPS de mamão não seja regulada pelo sistema de fosforilação que ativa/inibe a enzima de outras fontes (Huber *et al.*, 1989; Weiner *et al.*, 1992). A enzima poderia ser comparada à da folha da soja, que parece não ser regulada pelo sistema de fosforilação, além de sofrer pouca influência dos metabólitos. Neste caso, Nielsen & Huber (1989) sugerem que o sítio alostérico ou não existe ou não é funcional, e que a atividade desta enzima parece depender apenas da quantidade de proteína ativa e dos níveis de substrato presentes, uma vez que não foram observadas modificações de hexoses-fosfato durante o ciclo claro-escuro.

4.3. RESPIRAÇÃO E PRODUÇÃO DE ETILENO DURANTE O AMADURECIMENTO DE MAMÕES IRRADIADOS E NÃO-IRRADIADOS

Os perfis de respiração e produção de etileno durante o amadurecimento dos mamões irradiados e não-irradiados, se encontram na Figura 4.

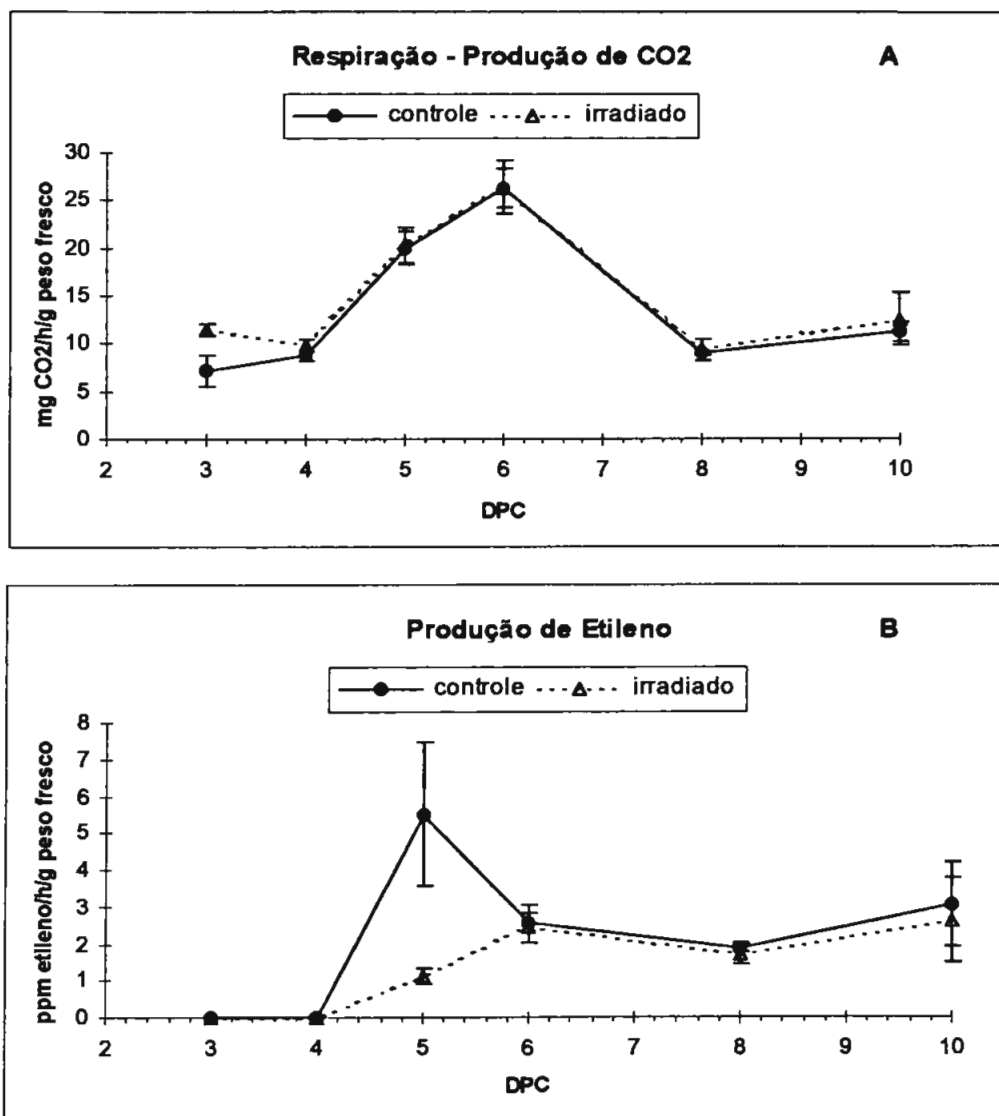


Figura 4. (A) Respiração e (B) produção de etileno por mamões irradiados e não-irradiados durante o amadurecimento.

Podemos perceber, pelos teores de CO₂ produzidos (figura 4A), que não houve diferença significativa entre a respiração de mamões irradiados e não-irradiados, a não ser no primeiro dia (3^o DPC), logo após a irradiação, o que, de

acordo com a literatura, é normal para frutos irradiados (Paull, 1994). Esse aumento na respiração é gerado pelo próprio processo de irradiação, e é contornado pelo processo de homeostase das células, o que ocorre somente quando a dose aplicada não for excessiva (Awad, 1993). Akamine & Goo (1977) afirmam que o mamão é o fruto mais tolerante à radiação, o que pode ser verificado pelo aumento mínimo na respiração imediatamente após a irradiação (Figura 4A). O pico de respiração para ambos os tratamentos ocorreu no 6ºDPC.

Quanto aos teores de etileno (Figura 5B), nota-se uma significativa diferença no 5º DPC, onde ocorre um pico de etileno em mamões não-irradiados, o que não aconteceu com os mamões irradiados. Nestes, o pico ocorreu um dia depois (6º DPC) e com menos de 50% da concentração de etileno produzida pelos mamões não-irradiados. Nos demais pontos, a produção de etileno foi semelhante para ambos os tratamentos. A irradiação parece ter afetado a produção de etileno em mamões da mesma forma que em peras que, quando irradiadas, apresentam uma menor produção de etileno (Maxie & Abdel-Kader, 1966). Desta forma, especula-se que o amadurecimento de frutos irradiados é retardado devido à menor capacidade de estes produzirem etileno; isto pode ocorrer devido ao comprometimento das enzimas que sintetizam o etileno. Pelos resultados obtidos, isto poderia ser aplicado no caso de mamões. Os valores em elevação de etileno e CO₂ obtidos no último dia de análise (10 DPC) podem ser devidos ao início do processo de senescência dos frutos.

4.4. TEORES DE CARBOIDRATOS DURANTE O AMADURECIMENTO DE MAMÕES IRRADIADOS E NÃO-IRRADIADOS

4.4.1. AMIDO

A determinação de amido pelo método convencionalmente utilizado (Arêas & Lajolo, 1981) nos forneceu resultados muito baixos, que variavam entre 0,1-0,5% de amido em frutos verdes. Para nos certificarmos destes resultados, testamos a extração de amido utilizando DMSO (Carpita & Kanabus, 1987), além de um método que quantifica o teor de amido resistente presente na amostra (Champ, 1992), para afastar a possibilidade de o método convencional não o estar detectando em sua totalidade.

Por todos os métodos utilizados, chegamos a resultados muito semelhantes: cerca de 0,13% de amido nos frutos verdes controle, 0,23% nos frutos verdes irradiados, e nos frutos maduros, encontramos cerca de 0,06% de amido, tanto em frutos irradiados quanto nos não-irradiados (Tabela 4). Nossos resultados são equivalentes aos apresentados por Paull (1996), Chan *et al.* (1979) e Selvaraj (1982), que encontraram aproximadamente 0,5% e menos de 0,1% de amido em mamões nos estágios verde e maduro, respectivamente. Por estes resultados, podemos perceber que o mamão não possui reserva de amido para ser degradado durante o amadurecimento, como a banana, por exemplo. Assim, se houver síntese de açúcares durante este período, a fonte de carbono é ainda desconhecida.

Tabela 4. Teores de amido (em porcentagem) durante o amadurecimento de mamões irradiados e não-irradiados.

	3 dpc	4 dpc	5 dpc	6 dpc	8 dpc	10 dpc
controle	0,13	0,11	0,08	0,05	0,04	0,06
irradiado	0,23	0,16	0,10	0,07	0,08	0,06

4.4.2. AÇÚCARES SOLÚVEIS

Analisando-se os resultados dos teores de açúcares solúveis totais (glicose, frutose e sacarose), verificamos que estes permaneceram praticamente constantes durante o amadurecimento. Hubbard *et al.* (1991), trabalhando apenas com frutos não irradiados, demonstraram que os teores de carboidratos solúveis pouco mudam entre aproximadamente 4 e 10 dias após a colheita. Beyers *et al.* (1979), após estudo com frutos irradiados com 0,75 kGy, verificou que a composição nutricional de mamões irradiados e não-irradiados é muito semelhante. Entretanto, percebemos que mamões irradiados, os teores de açúcares solúveis totais parecem ser levemente menores do que nos frutos não-irradiados (Figura 5D). Nossos resultados apresentam teores de açúcares solúveis totais que aumentam de cerca de 9% no estágio verde (3dpc) a aproximadamente 11% no estágio maduro (10dpc) nos mamões não-irradiados, resultados de acordo com Paull (1996), que descreveu níveis de 11,5% de açúcares

totais neste estágio. Entretanto, Chan & Kwok (1975) encontraram níveis um pouco maiores de açúcares totais, cerca de 15% em frutos maduros que permaneceram ligados à planta.

Nos frutos irradiados, não foram encontradas alterações significativas nos teores de açúcares totais durante o amadurecimento. D'Innocenzo (1996) observou que mamões irradiados têm as atividades das enzimas de hidrólise de parede celular diminuídas, o que nos leva a acreditar que possivelmente haja uma diminuição da colaboração dos açúcares provenientes da quebra da parede celular no adoçamento destes frutos. Isto poderia explicar os teores mais baixos de açúcares solúveis totais em comparação aos frutos não-irradiados.

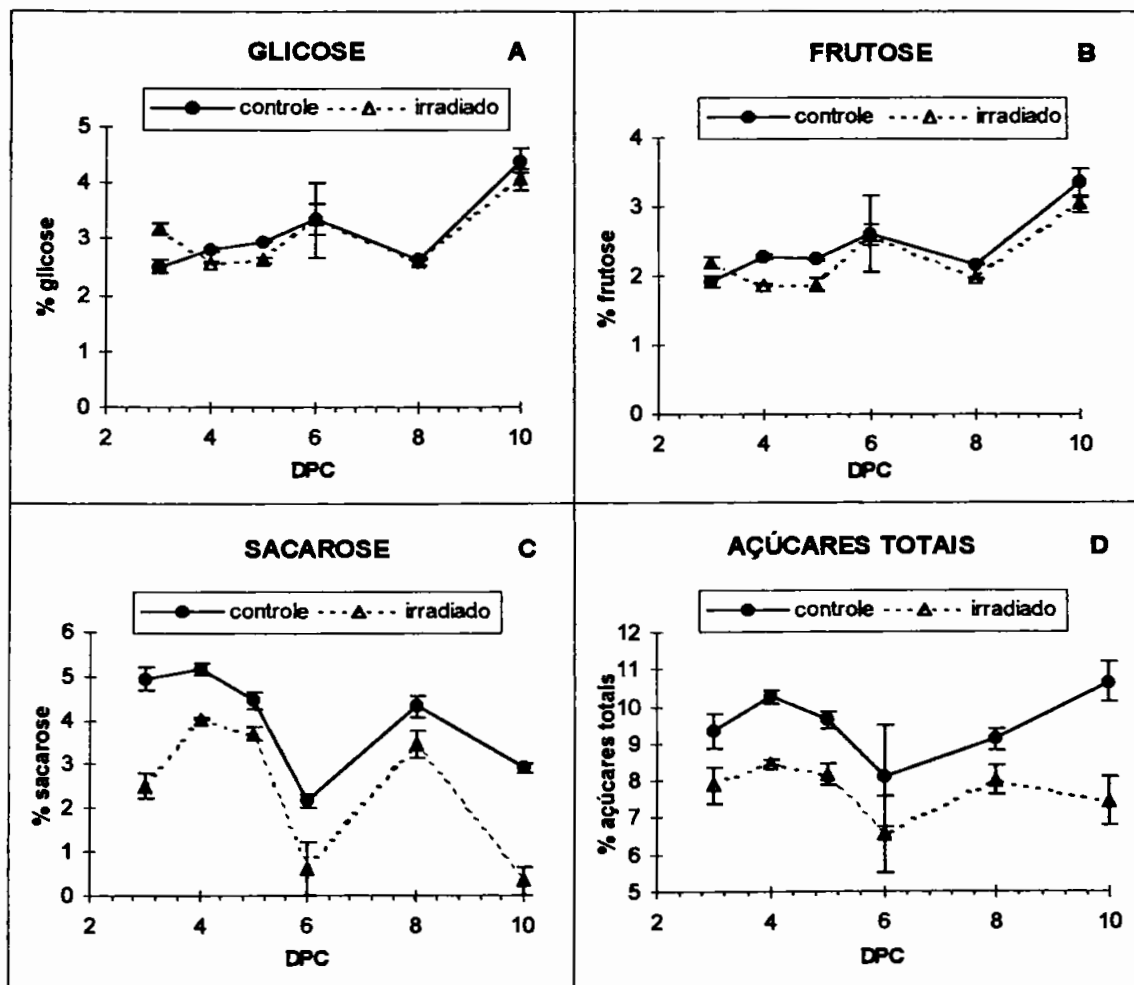


Figura 5. Teores de açúcares solúveis (A) glicose, (B) frutose, (C) sacarose e (D) açúcares solúveis totais, calculado como soma dos demais, em mamões irradiados e não-irradiados durante o amadurecimento. Cada ponto representa a média de duplicata de extração e triplicata de determinação da amostra.

Quanto aos teores de glicose e frutose, podemos ver, pelas Figuras 5A e 5B, que permaneceram praticamente inalterados durante o amadurecimento, aumentando apenas ao final (8° a 10° DPC), provavelmente em função da atividade de invertases, já que o nível de sacarose diminui no mesmo período. Também no final do amadurecimento, as estruturas celulares já estão em desorganização, permitindo o acesso de invertases à sacarose intracelular, que se encontravam em compartimentos diferentes.

Os teores de sacarose (Figura 5 C) em mamões não-irradiados variaram de 3 a 5% no decorrer do amadurecimento, tendo uma queda no dia correspondente ao pico de respiração (6° DPC). O aumento da respiração envolve a quebra e oxidação de açúcares e ácidos orgânicos, liberando moléculas mais simples, e estando acoplada a moléculas de transferências de energia, como ATP, NADH, e produção de CO₂, H₂O e calor. Em mamões irradiados, os teores de sacarose foram um pouco menores, variando entre 0,5 e 4,0%. As principais diferenças entre os tratamentos ocorreram no 1° DPC, quando o teor de sacarose do frutos irradiados foi cerca de 2,5 vezes menor que o controle (possivelmente devido à hidrólise pelo processo de irradiação) e no 10° DPC, quando o teor de sacarose em mamões irradiados foi cerca de 6 vezes menor em relação ao controle. Tendo em vista a pequena variação nos teores de sacarose durante o amadurecimento, podemos dizer que a sacarose parece ser acumulada principalmente enquanto o fruto está no período pré-climatérico, ainda ligado à planta, provavelmente em função do carbono fixado pela fotossíntese. Mas, como podemos ver no caso de frutos irradiados, que sofrem hidrólise da sacarose logo após a irradiação, e no caso dos teores de sacarose que diminuem no 6°DPC, verifica-se que existe síntese de sacarose, e, neste caso, necessariamente deve haver uma fonte de carbono a ser utilizada. Uma possibilidade seriam os polissacarídeos constituintes da parede celular que, em geral, contém aproximadamente 30% de celulose, 30% de hemicelulose, 35% de pectina e 5% de proteínas em dicotiledôneas.

Quantitativamente, a maior mudança na composição da parede celular, associada ao amadurecimento de muitos frutos, é a perda de quantidades significativas de açúcares neutros, especialmente galactose e arabinose. As vias enzimáticas para a perda de galactose são desconhecidas, mas têm sido associadas à degradação de galactanas por β -galactosidases (Bacic *et al.*, 1988). Estudos feitos com tomates mostraram que a galactose ativa a produção de etileno, potencializando o processo de amadurecimento (Kim *et al.*, 1991). Da mesma forma, foi demonstrado que, em pedúnculos de abacate, a galactose é um dos precursores para a formação da sacarose (Gross & Pharr, 1982). No mamão e na manga, β -galactosidases e poligalacturonases parecem estar intimamente ligadas à crescente solubilização da pectina e amaciamento durante o amadurecimento (Lazan *et al.*, 1995).

Neste caso, talvez a parede celular possa estar fornecendo substrato para a síntese de sacarose via galactose. Por isso, foram isolados os polissacarídeos da parede celular de mamões verde (3DPC), intermediário (6DPC) e maduro (10DPC), cujos resultados estão descritos a seguir.

4.4.3. AÇÚCARES DE PAREDE CELULAR

Os resultados das análises dos polissacarídeos solúveis em água da parede celular de mamões em diferentes estágios de amadurecimento encontram-se na Tabela 4, onde podemos observar que ocorrem diversas modificações nos açúcares provenientes da parede celular do mamão. Há um acúmulo de ramnose, enquanto que a arabinose e xilose permanecem praticamente constantes. Mas a principal característica é uma diminuição nos teores de galactose e um aumento nos teores de glicose (aumento da relação glicose/galactose), que foram melhor demonstrados na Figura 6. Parece estar ocorrendo uma desgalactosilação da cadeia polissacarídica principal, fenômeno já bem demonstrado em frutos durante o amadurecimento, como maçãs, morangos, tomates (Pressey, 1983) e mangas (Muda *et al.*, 1995), ocorrendo também em sementes em germinação (Brett & Waldron, 1990).

Tabela 4. Conteúdo de açúcares provenientes de polissacarídeos solúveis em água, de parede celular de mamões irradiados e não-irradiados durante o amadurecimento. Resultados fornecidos em porcentagem.

P.S.A.	3 DPC		6 DPC		10 DPC	
	Controle	Irradiado	Controle	Irradiado	Controle	Irradiado
RAMNOSE	15.8	7.6	18.3	14.9	30.4	16.5
ARABINOSE	13.2	11.3	13.6	14.2	14.8	14.7
XILOSE	5.6	4.8	4.7	6.9	5.8	6.5
GALACTOSE	57.3	60.6	60.0	52.7	38.9	39.0
GLICOSE	8.1	15.7	3.30	11.2	10.0	23.2
Relação GLI/GAL	170	270	115	348	415	405

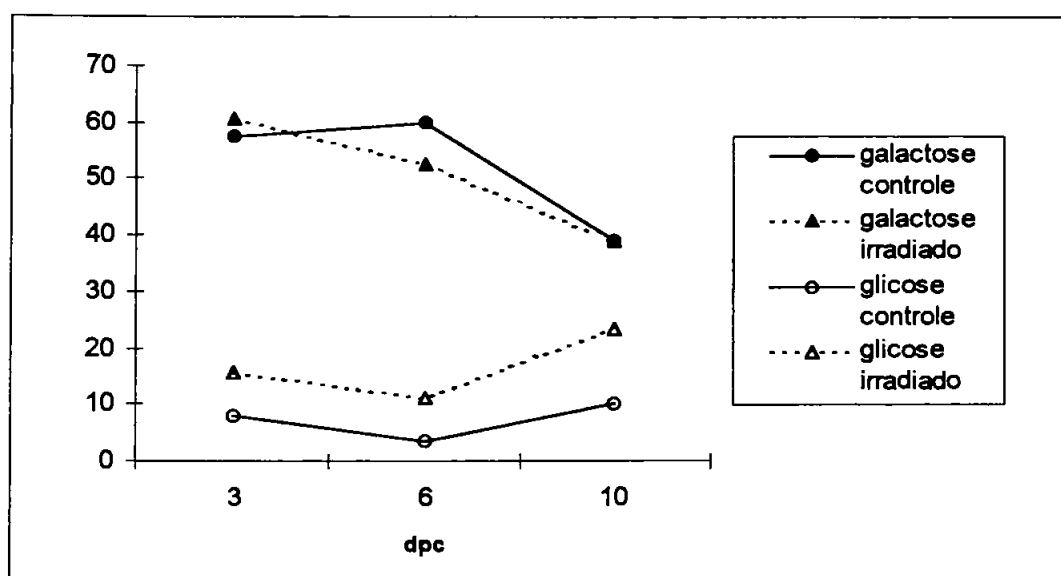


Figura 6. Variação de glicose e galactose provenientes dos polissacarídeos solúveis em água de parede celular em três estágios de amadurecimento (verde, intermediário e maduro).

Koh & Melton (1994) afirmam que a galactose é o maior componente dos polissacarídeos de parede celular de mamões, o que também foi por nós verificado.

Pode ser observado que os teores de galactose em mamões irradiados e não-irradiados são bastante semelhantes. Entretanto, mamões irradiados apresentam maior conteúdo de glicose como um todo, cerca de 2 vezes maior que os mamões controle. Percebe-se, pela relação glicose/galactose, que ambos os tratamentos alcançam a mesma proporção final, sendo que o mamão irradiado o faz mais rapidamente que os

mamões controle. Muda *et al.* (1995) verificaram que, em mangas, ocorre um aumento na atividade da β -galactosidase, com conseqüente diminuição dos teores de resíduos galactosil. Roe & Bruemner (1981) observaram que o amolecimento de mangas está bastante relacionado a um declínio do conteúdo de pectinas solúveis em álcali, apesar de haver também uma diminuição nos teores de pectinas solúveis em água. A remoção de resíduos de galactose dos polissacarídeos de parede celular poderiam estar levando a uma diminuição do seu peso molecular, fazendo com que sua solubilidade seja aumentada. Em kiwis (Redgwell & Harker, 1995), e mamões (Lazan *et al.*, 1995), entretanto, foi verificado que a perda de galactose e a solubilização das pectinas são processos independentes entre si, e que o primeiro pode ser, em parte, independente do etileno endógeno.

Apesar da diminuição da galactose da parede celular, não ocorreu acúmulo desta como açúcar solúvel no fruto, durante o amadurecimento, indicando que deve ser prontamente metabolizado (Tabela 5).

Tabela 5. Porcentagens de galactose livre em três estágios de amadurecimento de mamões irradiados e não-irradiados.

	3 dpc	6 dpc	10 dpc
Controle	0,037	0,045	0,026
Irradiado	0,026	0,037	0,036

Uma hipótese que merece ser explorada é de que esta galactose seja mobilizada para a síntese da sacarose, como no esquema apresentado a seguir.

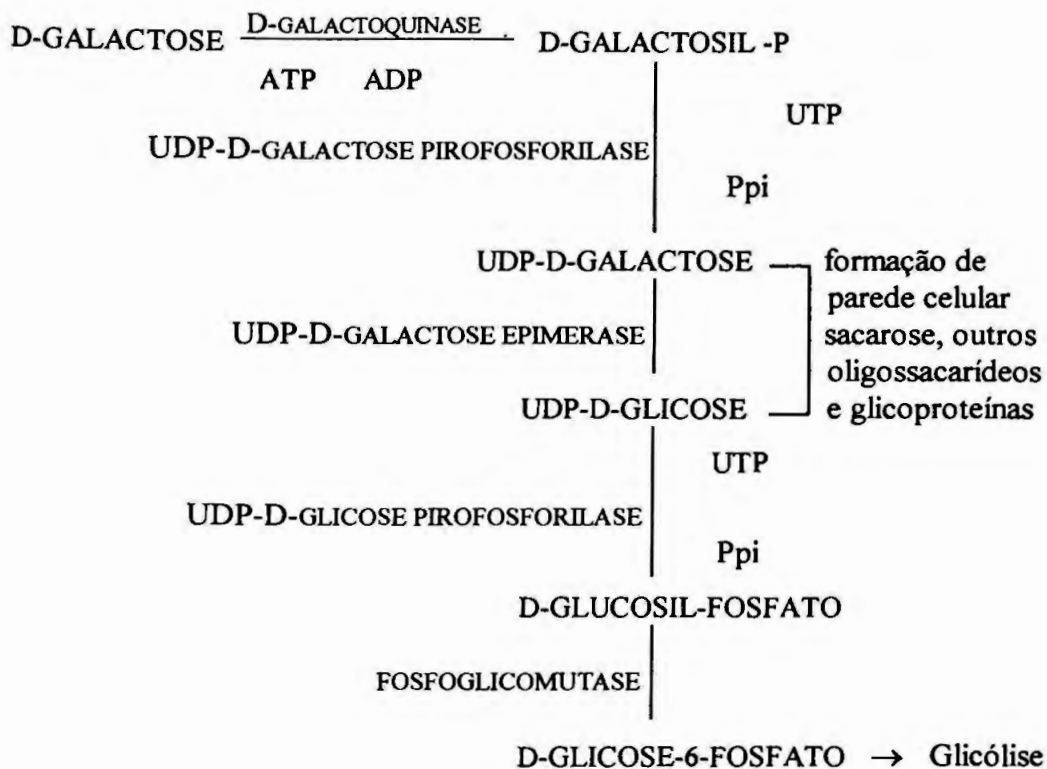


Figura 7. Metabolismo da D-galactose em plantas (Dey, 1985)

4.5. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DURANTE O AMADURECIMENTO DO MAMÃO

4.5.1. SACAROSE SINTASE E SACAROSE-FOSFATO SINTASE

Em função da baixa atividade da SS e SPS encontrada nos extratos de mamão, foi muito difícil otimizar o método de extração e atividade. Esta dificuldade pode ser também atribuída à presença de outras enzimas, tais como hexoses-fosfato isomerases, sacarose fosfatases, UDPases, fosfatases inespecíficas e invertases, além da notória instabilidade da SPS (Hawker, 1985). Podemos incluir também a presença significativa de proteases no extrato, que poderiam estar atuando sobre as enzimas.

Não encontramos correlação entre a atividade da SS (Figura 8A) e a síntese de sacarose ou metabolismo do amido. Mas, ao contrário da SS da banana, sua atividade não caiu a níveis indetectáveis ao final do amadurecimento.

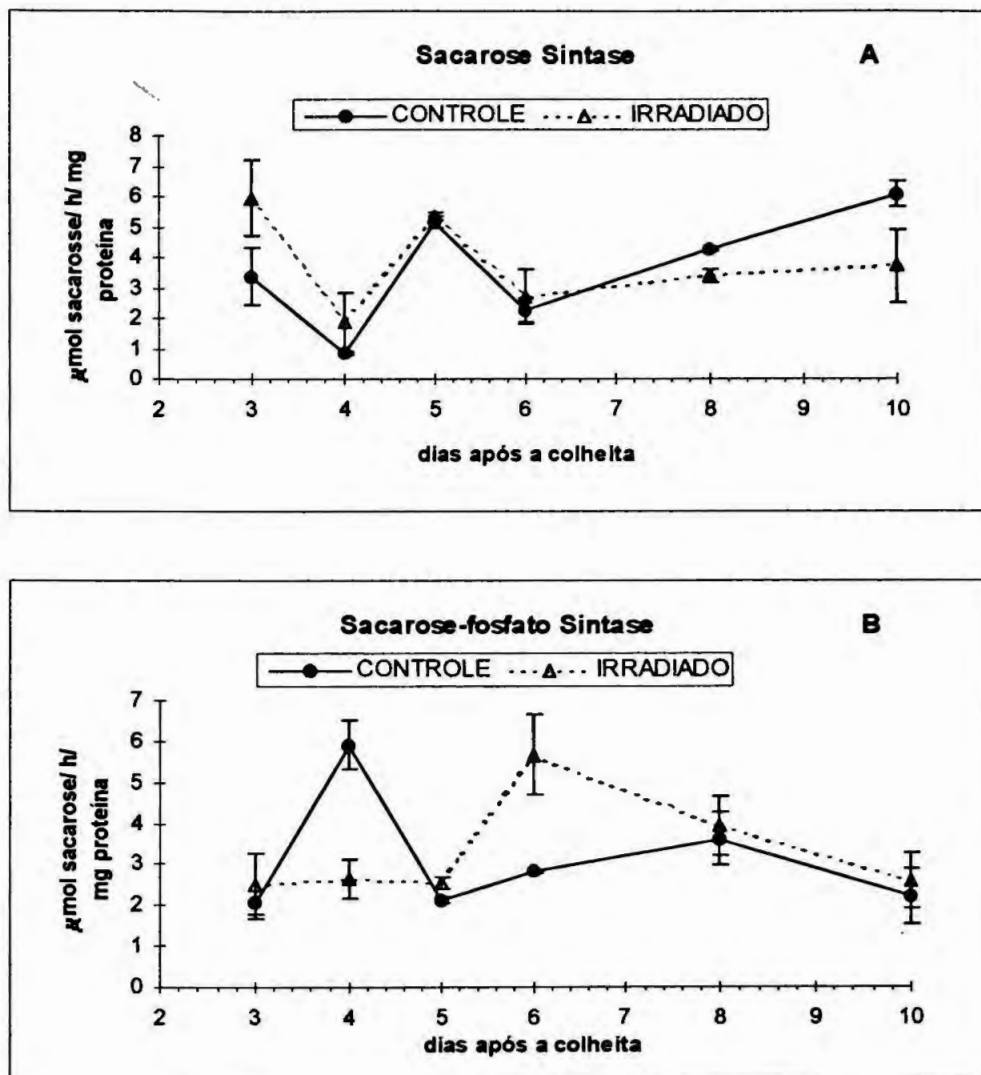


Figura 8. Atividade de (A) SS e (B) SPS em mamões irradiados e não-irradiados durante o amadurecimento. Cada ponto representa a média de quadruplicata de extração e determinação.

Não encontramos, também, diferenças significativas entre a SS de mamões irradiados e não-irradiados. Somente no final do amadurecimento, do 6º ao 10º DPC, a SS de mamões não-irradiados tem um aumento de atividade de cerca de 2 vezes em relação aos frutos irradiados. Percebemos a ocorrência de um pico de atividade aos 5 DPC, ponto onde começa a haver hidrólise da sacarose (Fig.5C, página 38). Não podemos afirmar se há ou não correlação entre ambos, mas sabe-se que a enzima possui atividade hidrolítica da sacarose. Nielsen *et al.* (1991) demonstraram que, em

pimenta doce ocorre uma degradação da sacarose no período final do crescimento do fruto, provavelmente originada pela ação da sacarose sintase.

Os resultados das atividades da SPS (Figura 8B) demonstram que ocorre um atraso de 2 dias no pico de atividade no caso de mamões irradiados. Entretanto, parece não haver correlação entre essa atividade e o comportamento da sacarose durante o amadurecimento. O mesmo foi verificado em pêras (Moriguchi *et al.*, 1992), onde, apesar de haver um aumento da atividade de SPS e concomitante acúmulo de sacarose, estes não estavam correlacionados. Em bananas não foi observada relação entre atividade máxima da SPS e o teor final de sacarose (Mota, 1997; Nascimento, 1997). O que se vê é uma relação entre atividade da SPS e presença de sacarose acumulada (Cordenunsi, 1989; Hubbard, 1990). O mesmo ocorre em tomates (Dali *et al.*, 1992, citados por Nascimento, 1997), melões (Hubbard, 1990), e kiwi (MacRae *et al.*, 1992), embora seu mecanismo de regulação seja desconhecido. Nossos resultados confirmam esta hipótese, pois, apesar de os teores de açúcares solúveis totais nos mamões irradiados serem menores que nos mamões não-irradiados, a atividade da SPS não é significativamente diferente, em termos numéricos. Em folhas de soja, por exemplo, a atividade depende da quantidade da proteína ativa presente no extrato, regulada por um ritmo endógeno que é determinado pelos níveis de hexose-P do tecido durante o dia. A mesma dependência pela quantidade de proteínas foi verificada em bananas (Nascimento, 1997).

Em mamões irradiados, o pico de atividade parece coincidir com o ponto de maior necessidade da síntese de sacarose (6^oDPC), onde está havendo hidrólise da sacarose, provavelmente associada ao aumento da respiração. Apesar de esta hidrólise ocorrer também em frutos não-irradiados, pode-se supor que a colaboração dos açúcares de parede celular neste caso poderia aliviar a necessidade de um grande aumento na atividade da SPS.

Foram feitas eletroforeses dissociantes (SDS-PAGE) com as amostras controle e irradiado aos 5 DPC, cujo resultado apresenta-se na Figura 9. A obtenção de resultados confiáveis quanto à eletroforese dissociante de mamão foi bastante trabalhosa em função da ação de proteases, pois apesar de todos os cuidados

necessários, parece ter ocorrido proteólise de forma bastante acentuada. Enquanto foram utilizados métodos convencionais de extração das proteínas (Laemmli, 1965; Dominguez-Puigjaner *et al.*, 1992) obtivemos eletroforeses com predominância de proteínas com baixos pesos moleculares, por volta de 30 kD. O Western blotting destas mesmas amostras não apresentou reação cruzada entre as enzimas de mamão e de banana, isto é, os anticorpos anti-SS e anti-SPS de banana não reconheceram as enzimas no mamão. Os resultados obtidos ao seguir o procedimento descrito por Dominguez-Puigjaner (1992) foram semelhantes, apresentando eletroforese com predominância de proteínas de baixo peso molecular, e não havendo reação cruzada com os anticorpos de SS e SPS de banana (dnm). Somente quando procedemos à extração convencional utilizada para as enzimas, (tampão e procedimento descritos nos itens 4.4.1 e 4.4.2, páginas 28 a 32), é que obtivemos resultados satisfatórios. A partir do extrato protéico obtido, procedemos à precipitação com TCA em concentração final de 12%, e também tratamento com fenol (Dominguez-Puigjaner *et al.*, 1992).



Figura 9. Perfil eletroforético dissociante das proteínas de mamões 5 DPC não-irradiado. (A) padrão de peso molecular (B) proteínas do extrato de banana 7 DPC (C) proteínas do extrato de mamão, seguindo o método de Dominguez-Puigjaner *et al.* (1992) (D) proteínas do extrato de mamão, seguindo o procedimento de precipitação com TCA. Os padrões de pesos moleculares foram constituídos por anidrase carbônica (29 kD), ovoalbumina (45 kD), albumina de soro bovino (66 kD), fosforilase (97 kD), e β -galactosidase (116 kD).

Observamos que houve uma boa separação eletroforética, evidenciando melhor extração e menor atividade proteásica. Revelaram-se bandas de diversos pesos moleculares, com predominância de uma banda de aproximadamente 80 kD. A precipitação direta com TCA pareceu ser mais eficiente que o procedimento que envolve o tratamento com fenol e precipitação com metanol, pois verificamos menor quantidade de proteínas de baixo peso molecular. É possível que, durante o procedimento de tratamento do extrato com fenol, seguido das lavagens, ter havido ação de proteases, originando tal perfil.

O Western blotting (Figura 10) demonstrou haver reação cruzada entre as enzimas SS e SPS de mamão e os anticorpos contra essas enzimas da banana. Entretanto, no mamão, a proteína SPS apresentou-se com menor peso molecular, o que pode evidenciar a ação, ainda que limitada, de proteases. Desta forma, testamos o uso de inibidores de proteases na solução extratora, o que não surtiu o efeito desejado, não apresentando diferenças em relação ao extrato sem inibidores (dns). A proteína SS apresentou PM maior do que a enzima da banana.

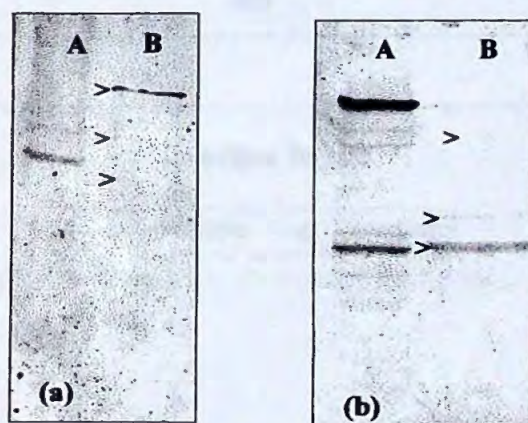


Figura 10. Western blotting das enzimas (a) SS e (b) SPS de mamão contra anticorpos da banana. (A) proteínas do extrato de banana 7 DPC (B) proteínas do extrato de mamão não-irradiado 5 DPC, extraídas pelo novo método, seguido de precipitação com TCA.

Desta forma, podemos concluir que a SS e a SPS de mamão possuem estruturas semelhantes às da banana, apesar de necessitarem de condições tão

diferentes de extração e determinação das suas atividades. Nascimento (1997) observou que o sequenciamento genético de SPS de diferentes fontes apresentava regiões bastante conservadas. Podemos especular que a enzima do mamão deva manter essas regiões características.

4.5.2. INVERTASES NEUTRA E ÁCIDA

As atividades das invertases ácida e neutra podem ser vistas na Figura 11.

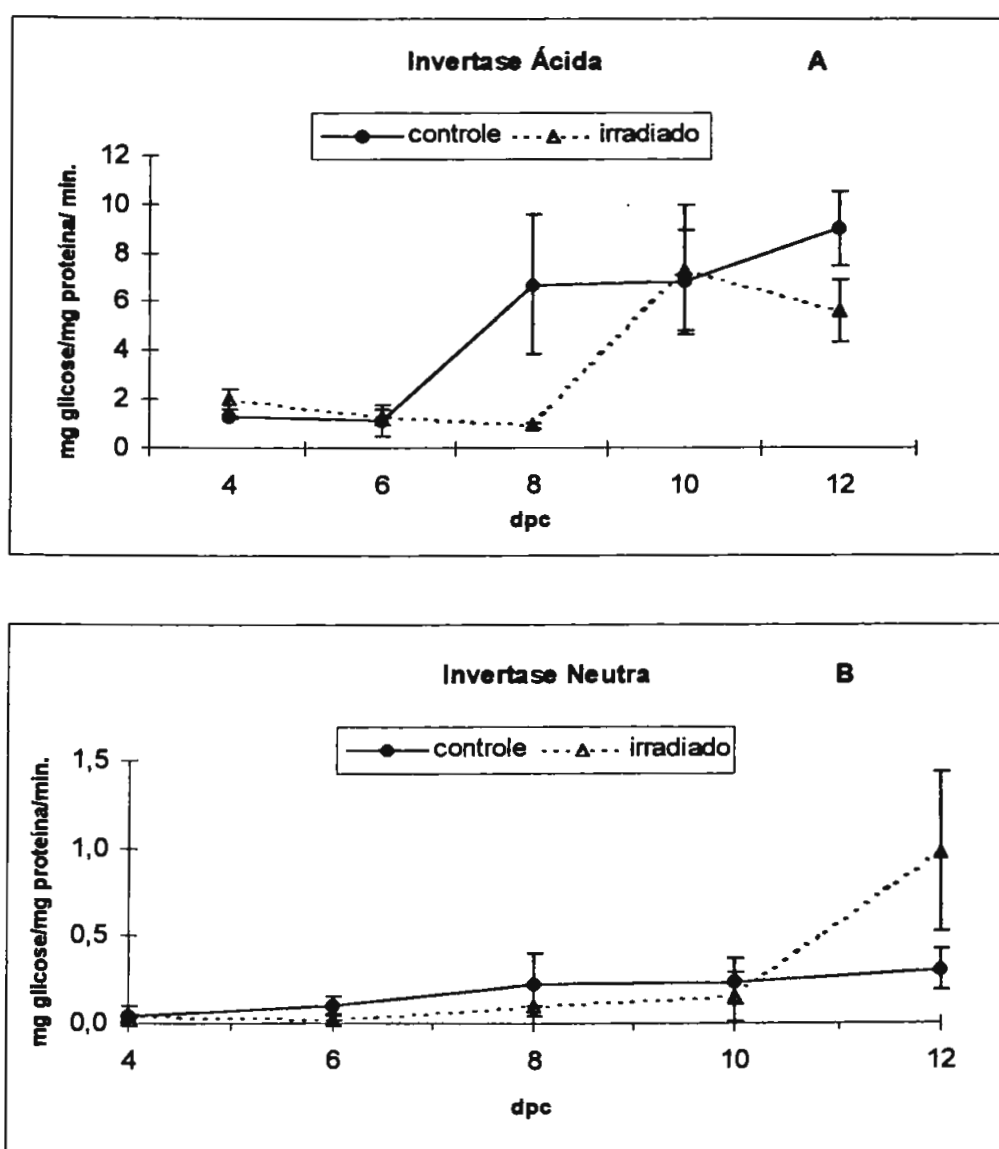


Figura 11. Atividade das invertases ácida (A) e neutra (B) em mamões irradiados e não-irradiados. Cada ponto representa a triplicata de extração e determinação de atividade.

A atividade da invertase ácida aumentou cerca de 10 vezes no mamão controle e 4 vezes no mamão irradiado, como pode ser visto na Figura 11A. Este resultado está de acordo com o obtido por Pal & Selvaraj (1987), que observaram o aumento brusco (cerca de 30 vezes em 5 dias) na atividade da invertase durante o amadurecimento. Não foi um resultado comum, uma vez que a invertase ácida é mais comumente encontrada em tecidos em crescimento, com rápida expansão celular, onde é necessária a hidrólise de grandes quantidades de sacarose veiculada da folha para o fruto, para a síntese de precursores da parede celular. À medida que o tecido completa seu desenvolvimento e está maduro, fisiologicamente, é mais comum encontrarmos atividade da invertase neutra (Dey & Dixon, 1985).

Por outro lado, a invertase neutra (Figura 11B) apresentou baixa atividade que permaneceu praticamente constante durante todo o amadurecimento, a não ser em mamões irradiados, onde a atividade no 12º DPC é cerca de 4 vezes maior que em mamões não-irradiados. Estes resultados podem explicar a hidrólise mais acentuada da sacarose nos frutos irradiados no final do amadurecimento (Figura 5C), cerca de 6 vezes maior que em frutos não-irradiados. Em comparação à atividade da invertase ácida, a atividade da invertase neutra foi cerca de 5 vezes menor, em frutos irradiados, e 20 vezes menor em mamões irradiados.

A irradiação parece retardar o aumento de atividade das invertases ácidas em 2 dias em relação ao controle. Nas invertases neutras, observa-se que a irradiação pareceu acelerar a atividade no último dia de análise, diferindo neste ponto os frutos irradiados e não-irradiados.

5. CONCLUSÕES

- Frutos inteiros podem ser amostrados pelo sistema de batoques, ao longo do amadurecimento, sem apresentar sinais expressivos de estresse.

- A sacarose no fruto maduro parece ser, na maior parte, acumulada quando o fruto apresenta-se ligado à planta-mãe, provavelmente via fotossíntese. Apesar disso, parece ocorrer síntese de sacarose durante todo o amadurecimento do mamão.

- A irradiação gama parece não afetar consideravelmente a respiração e teores de açúcares totais de mamões, bem como a atividade da sacarose sintase. Entretanto, a produção de etileno é diminuída, e a atividade da invertase ácida é atrasada em cerca de 2 dias, assim como a atividade da sacarose-fosfato sintase, e a atividade da invertase neutra é aumentada no último dia de análise, somente em mamões irradiados.

- A atividade da invertase ácida aumentam consideravelmente durante o amadurecimento, enquanto que a atividade da invertase neutra permanece praticamente constante. A atividade da invertase ácida é maior que a da invertase neutra durante todo o amadurecimento do mamão.

- A sacarose sintase apresenta um pico de atividade aos 5 DPC, embora não sofra grandes variações durante o amadurecimento. Esse pico pode ser relacionado à degradação da sacarose que ocorre um dia depois.

- A atividade da sacarose-fosfato sintase apresenta, em ambos os tratamentos, um pico de atividade, sendo que em mamões irradiados, este pico é atrasado em dois dias. Não foi possível fazer correlações entre a atividade da SPS e o metabolismo de sacarose.

- A SS e SPS de mamão são reconhecidas pelos anticorpos contra estas enzimas de banana, havendo, portanto, características estruturais em comum entre ambas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AKAMINE, E.T., GOO, W. Respiration, ethylene production and shelf-life extension in irradiated papaya fruit after storage under simulated shipping conditions. **Tech. Bull-Hawaii Agric. Exp. Stn**, Honolulu, v.33, p.1-12, 1977.
- AKAMINE, E.T., GOO, W. Concentrations of carbon dioxide and ethylene in the cavity of attached papaya fruit. **HortScience**, St. Joseph, v.14, p.138-139, 1979.
- AKAZAWA, T., OKAMOTO, T. Biosynthesis and Metabolism of sucrose. In: STUMPF, P.K., CONN, E.E. eds. **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1980. v.3, p. 199-270.
- ALVAREZ, A.M., NISHIJIMA, W.T. Postharvest disease of papaya. **Plant Disease**, St. Paul, v.71, p.681-686, 1987.
- ARÊAS, J.A.G., LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening I: the phosphorylase and phosphatase behavior in *Musa acuminata*. **J. Food Biochem.**, Westport, v.5, p.19-37, 1981.
- ARIAS, C.J. Importancia de la tecnologia postcosecha. **Tecnologia Postcosecha de frutas y verduras (CYTED-RITEP)**, Habana, enero, p.3-8, 1998.
- AWAD, M. **Fisiologia pós-colheita de fruta**. São Paulo: Nobel, 1993. 114p.
- BACIC, A., HARRIS, P.J., STONE, B.A. Structure and function of plant cell walls. In: STUMPF, P.K., CONN, E.E., eds. **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1988. v.3, p.199-270.
- BALOCK, J.W., BURDITT, A.K., SEO, S.T., AKAMINE, E.K. Gamma radiation as a quarantine treatment for hawaiian fruit flies. **J. Econ. Entomol.**, Baltimore, v.59, p.202, 1966.
- BENDAZZOLI, W.S. **Purificação e caracterização parcial da sacarose sintase de banana (*Musa cavendishii* var. Nanicão)**. São Paulo, 1995. 65p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- BERGMEYER, H.U., ed. **Methods of Enzymatic Analysis**. 2.ed. New York: Academic Press, 1974. v.3, p.1212-1215.

* De acordo com a norma NBR6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT).
As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 1995.

- BEYERS, M., THOMAS, A.C., VAN TONDER, A.J. Irradiation of subtropical fruits. 1. Compositional tables of mango, papaya, strawberry and litchi fruits at the edible-ripe stage. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.27, p.37-42, 1979.
- BEYNON, R.J. Prevention of uncontrolled proteolysis. In: HARRIS, E.L.V., ANGAL, S. **Protein purification methods - a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1995. p.40-50.
- BIRTH, G.S., DULL, G.G., MAGEE, J.B., CHAN, H.T., CAVALETTO, C.G. An optical method for estimating papaya maturity. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, St. Joseph, v.109, p.62-66, 1984.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Baltimore, v.72, p.248-254, 1976.
- BRETT, C., WALDRON, K. **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls**. London: Unwin Hyman, 1990. p.169-175.
- BUTTLE, D.J., RITONJA, A., DANDO, P.M., ABRAHAMSON, M., SHAW, E.N., WIKSTROM, P., TURK, V., BARRET, A.J. Interaction of papaya proteinase IV with inhibitors. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.262, n.1, p.58-50, 1990.
- CAMARA, M.M., DIEZ, C., TORIJA, M.E. Changes during ripening of papaya fruit in different storage systems. **Food Chem.**, Essex, v.46, p.81-84, 1996.
- CARPITA, N. C., KANABUS, J. Extration of starch by dimethyl sulfoxide and quantitation by enzymatic assay. **Anal. Biochem.**, Baltimore, v.161, p.132-139, 1987.
- CASTRILLO, M., KRUGER, N.J., WHATLEY, F.R. Sucrose metabolism in mango during fruit ripening. **Plant Sci.**, Shannon, v.84, n.1, p.45-51, 1992.
- CHAMP, M. Determination of resistant starch in foods and food products: interlaboratory study. **Eur. J. Clin. Nutr.**, London, v.46, suppl.2, p.551-562, 1992.
- CHAN Jr., H.T. Sugar composition of papayas during fruit development. **HortScience**, St. Joseph, v.14, n.2, p.140-141, 1979.
- CHAN Jr., H.T., KWOK, S.C.M. Importance of enzyme inactivation prior to extraction of sugars from papaya. **J. Food Sci.**, Chicago, v.40, p.70-771, 1975.
- CHAN Jr., H.T., KWOK, S.C.M. Isolation and characterization of a β -fructofuranosidase from papaya. **J. Food Sci.**, Chicago, v.41, p.320-323, 1976.

- CHAN, H.Y., LING, T.Y., JUANG, R.H., TING, I.N., SUNG, H.Y., SU, J.C. Sucrose synthetase in rice plants growth-associated changes in tissue specific distributions. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.94, p.1456-1461, 1990.
- CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M. (1995) Starch breakdown during banana ripening: Sucrose Synthase and Sucrose Phosphate Synthase. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.43, n.2, p.347-351, 1995.
- CORDENUNSI, B.R. **Síntese da sacarose no amadurecimento da banana. Envolvimento da Sacarose Sintase e Sacarose Fosfato Sintase.** São Paulo, 1989. 87p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- D'INNOCENZO, M. **Comportamento de enzimas da parede celular e textura da polpa relacionados ao tratamento de irradiação de mamões (*Carica papaya* L. cv. Solo) durante o amadurecimento.** Piracicaba, 1996. 85p.(Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura Luís de Queirós - USP).
- DEY, P.M. D-Galactose-containing oligosaccharides. In: DEY, P.M., DIXON, R.A. **Biochemistry of storage carbohydrates in green plants.** London: Academic Press, 1985. p.53-120.
- DEY, P.M., DIXON, R.A. **Biochemistry of storage carbohydrates in green plants.** London: Academic Press, 1985. cap.1, p.1-48.
- DOMINGUEZ-PUIGJANER, E., VENDRELL, M., LUDEVID, M.D. Differential protein accumulation in banana fruit during ripening. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.98, p.157-162, 1992.
- GEIGENBERGER, P., STTIT, M. Sucrose syntase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. **Planta**, Berlin, v.189, p.329-339, 1993.
- GROSS, K.C., PHARR, M. Cucumber fruit sucrose synthase isozymes. **Phytochemistry**, Oxford, v.21, n.6, p.1241-1244, 1982.
- HATCH, M.D ,GLASZIOU, K.T. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.38, p.344, 1963.
- HAWKER, J.S. Sucrose. In: DEY, P.M., DIXON, R.A. **Biochemistry of storage carbohydrates in green plants.** London: Academic Press, 1985. p.53-120.
- HUBBARD, N.L., PHARR, D.M. Developmental changes in carbohydrate concentration and activities of sucrose metabolizing enzymes in fruits of two *Capsicum annum* L. genotypes. **Plant Sci.**, Shannon, v.86, n.1, p.33-39, 1992.
- HUBBARD, N.L., PHARR, D.M., HUBER, S.C. Sucrose-phosphate Synthase and others sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.82, p.191-196, 1991.

- HUBBARD, N.L., PHARR, D.M., HUBER, S.C. Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose biosynthesis in ripening bananas and its relationship to the respiratory climateric. **Plant Physiol**, Bethesda, v.94, p.201-208, 1990.
- HUBER, J.L.A., HUBER, S.C., NIELSEN, T.H. Protein phosphorylation as a mechanism for the regulation of spinach leaf sucrose-phosphate synthase activity. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.270, n.2, p.681-690, 1989.
- IADEROZA, M., BLEINROTH, E.W., AZUMA, E.H. Efeitos da radiação ionizante na atividade da pectinesterase do mamão cultivar Solo. **Colet. Inst. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.18, n.1, p.76-82, 1988.
- IWATSUBO, T., TAKAHASHI, T., NAKAGAWA, H., OGURA, N., SATO, T. Purification and some properties of acid invertases of persimmon fruits. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v.56, n.12, p.1959-1961, 1992.
- LOPEZ, M.E., VATTUONNE, M.A., SAMPIETRO, A.R. Partial purification and properties of invertases from *Carica papaya* fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v.27, n.10, p.3077-3081, 1988.
- KATO, T., KABOTO, S. Properties of invertases in sugar storage tissues of citrus and changes in their activities during maturation. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.42, p.67, 1978.
- KIM, J., GROSS, K.C., SOLOMOS, T. Galactose metabolism and ethylene production during development and ripening of tomato fruit. **Postharvest Biol. Technol.**, Amsterdam, v.1, p.67-80, 1991.
- KOH, T.H., MELTON, L.D. Analysis of papaya cell wall polysaccharides. **ASEAN Food J.**, Kuala Lumpur, v.9, n.3, p.101-106, 1994.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 94, p.201-208, 1970.
- LAZAN, H., SELAMAT, M.K., ALI, Z.M. β -galactosidase, polygalacturonase and pectinesterase in differential softening and cell wall modification during papaya fruit ripening. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.95, p.106-112, 1995.
- LINGLE, S.E., DUNLAP, J.R. Sucrose metabolism in Netted Muskmelon fruit during development. **Plant Physiol**, Bethesda, v.84, p.386-389, 1987.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., RANDHALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.193, p.265-275, 1951.

- MAXIE, E.C., ABDEL-KADER, A. Food irradiation-physiology of fruits as related to feasibility of the technology. **Adv. Food Res.**, New York, v.15, p.105-143, 1966.
- McGLASSON, W.B., WADE, N.L., ADATO, I. **Phytohormones and related compounds.**, 1978. v.2, p.447-493.
- McKEE, R.A., SMITH, H. Purification of proteinases from *Carica papaya*. **Phytochemistry**, Oxford, v.25, n.10, p.2283-2287, 1986.
- McRAE, E., QUICK, W.P., BENKER, C., STITT, M. Carbohydrate metabolism during postharvest ripening in kiwifruit. **Planta**, Berlin, v.188, p.314-323, 1992.
- MIRON, D., SHAFFER, A.A. Sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase and invertase activities in developing fruits of *Lycopersicon esculentum* Mill and the sucrose accumulating *Lycopersicon hirsutum* Hum. and Bonpl. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.95, p.623-627, 1991.
- MORIGUCHI, T., ABE, K., SANADA, T., YAMAKI, S. Levels and role of sucrose synthase, sucrose-phosphate synthase, and acid invertase in sucrose accumulation in fruit of Asian pear. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, St. Joseph, v.117, n.2, p.274-278, 1992.
- MOTA, R.V. **Metabolismo amido-sacarose e determinação dos açúcares solúveis em alguns cultivares de banana (*Musa* spp.).** São Paulo, 1997. 74p.(Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- MURATA, T. Sucrose-phosphate synthetase from various plant origins. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.36, n.11, p.1877-1884, 1972.
- MURRAY, D.R. **Biology of food irradiation.** London: Research Studies Press, 1990. 255p.
- NASCIMENTO, J.R.O. **Purificação, caracterização parcial e expressão da sacarose-fosfato sintase durante o amadurecimento da banana.** São Paulo, 1997. 91p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- NASCIMENTO, J.R.O., CORDENUNSI, B.R., LAJOLO, F.M., ALCOCER, M.J.C. Banana sucrose-phosphate synthase gene expression during fruit ripening. **Planta**, Berlin, v.203, p.283-288, 1997.
- NIELSEN, T.H., HUBER, S.C. Unusual regulatory properties of sucrose-phosphate synthase purified from soybean (*Glycine max*) leaves. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.76, p.309-314, 1989.

- NIELSEN, T.H., SKJAERBAEK, H.C., KARLSEN, P. Carbohydrate metabolism during fruit development in sweet pepper (*Capsicum annuum*) plants. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.82, n.2, p.311-319, 1991.
- NORTH, M. J. Prevention of unwanted proteolysis. In: BOND, J.S., BEYNON, R.J.A. **Proteolytic enzymes: a practical approach**. Oxford: Inf. Press, 1989. p.112.
- PAL, D.K., SELVARAJ, Y. Biochemistry of papaya (*Carica papaya* L.) fruit ripening: changes in RNA, DNA, protein and enzymes of mitochondrial, carbohydrate, respiratory and phosphate metabolism. **J. Hortic. Sci.**, London, v.62, p.117-124, 1987.
- PAULL, R.E. Response of Tropical commodities to insect desinfestation treatments. **HortScience**, St. Joseph, v.29, n.9, p.988-996, 1994.
- PAULL, R.E. Pineapple and Papaya. In: SEYMOUR, G.B., TAYLOR, J.E., TUCKER, G.A. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman & Hall, 1996. p.302-315.
- PAULL, R.E., CHEN, N.J. Postharvest variation in cell-wall-degrading enzymes of papaya (*Carica papaya* L.) during fruit ripening. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.72, p.382-385, 1983.
- PERCHERON, F. Colorimetric determination of sucrose and fructofuranosidase by the tiobarbituric acid reaction. **C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.**, Paris, v.255, p.2521-2522, 1962.
- PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Anal. Biochem.**, Baltimore, v.83, p.346-356, 1977.
- PONTIS, H.G. Riddle of sucrose. In: NORTHCOTE, D.H., ed., **Plant Biochemistry II**. Baltimore: Univ. Park. Press, 1979. p.80-114 (International Review of Biochemistry, v.13).
- PRESSEY, R. Changes in sucrose synthetase and sucrose phosphate synthetase activities during storage of potatoes. **Am. Potato J.**, New Brunswick, v.47, p.245-251, 1970.
- PRESSEY, R. β -galactosidases in ripening tomatoes. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.71, p.132-135, 1983.
- PRIETO-MIRANDA, E.F. Uso de irradiación como tratamiento cuarentenario. **Tratamientos Físicos de Cuarentena en Frutos Tropicales e Subtropicales (CYTED)**. Habana, junio. p.53-57, 1997.

- REDGWELL, R.J., HARKER, R. Softening of kiwifruits discs: effect of inhibition of galactose loss from cell walls. **Phytochemistry**, Oxford, v.39, n.6, p.1319-1323, 1995.
- RODHES, M.J.C. The extraction and purification of enzymes from plants tissues. In: SMITH, H., ed. **Regulation of enzyme synthesis and activity in higher plants**. London: Academic Press, 1977. p.245-269.
- ROE, B., BRUEMMER, J.H. Changes in pectic substances and enzymes during ripening and storage of 'Keitt' mangos. **J. Food Sci.**, Chicago, v.544, p.200-214, 1981.
- SALERNO, G.L., PONTIS, H.G. Studies on the sucrose phosphate synthetase: kinetic mechanism. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.80, p.298-302, 1977.
- SALUNKE, D.K., BOLIN, H.R., REDDY, N.R. **Storage processing and nutritional quality of fruits and vegetables - fresh fruits and vegetables**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1991. v.1, cap.7, p.147-162.
- SAUCEDO-VELÓZ, C. Tratamientos físicos de cuarentena. **Tratamientos Físicos de Cuarentena en Frutos Tropicales e Subtropicales (CYTED)**. Habana, junio. p.7-14, 1997.
- SELVARAJ, Y., SUBRAMANYAM, M.D., IYER, C.P.A. Changes in the chemical composition of four cultivars of papaya (*Carica papaya* L.) during growth and development. **J. Hort. Sci.**, London, v.57, p.135-143, 1982.
- STITT, M., BULPIN, P.V., REES, T.A.P. Pathway of starch breakdown in photosynthetic tissues of *Pisum sativum*. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.544, p.200-214, 1978.
- STITT, M., HUBER, S., KERR, P. Control of photosynthetic sucrose formation. In: HATCH, M.D., BEARDMAN, N.K., eds. **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. San Diego: Academic Press, 1987. v.10, p.327-409.
- TAN, S.C., LAM, P.F. Effect of gamma irradiation of PAL activity and phenolic compounds in papaya (*Carica papaya* L.) and mango (*Mangifera indica* L.) fruits. **ASEAN Food J.**, Kuala Lumpur., v.1, p.134-136, 1985.
- THOMAS, P. Radiation preservation of foods of plant origin. III. Tropical fruits: bananas, mangoes and papayas. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Cleveland, v.23, n.2, p.147-205, 1986.
- TUCKER, G.A., GRIERSON, D. Fruit ripening. In: DAVIES, D.D., ed. **The biochemistry of plants**. San Diego: Academic Press, 1987. v.12, cap. 8, p.265-269.
-

- UMAÑA-ROJAS.,G. Manejo postcosecha de la papaya. **Tecnología Postcosecha de frutas y verduras (CYTED-RITEP)**, Habana, enero. p. 85-91, 1998.
- VIZZOTTO, G., PINTON, R., VARANINI, Z., COSTA, G. Sucrose accumulation in developing peach fruit. **Physiol. Plant**, Copenhagen, v.96, n.2, p.225-230, 1996.
- VU, J.V.C., NIEDZ, R.P., YELENOSKY, G. Activities of sucrose metabolism enzymes in glycerol-grown suspension cultures of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Environ. Exp. Bot.**, Oxford, v.35, n.4, p.455-463, 1995.
- WEINER, H., McMICHAEL Jr., R.W., HUBER, S.C. Identification of factors regulating the phosphorylation status of sucrose-phosphate synthase *in vivo*. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.99, p.1442-1453, 1992.
- WOLOSIUK, R.A., PONTIS, H.G. Evidence of the existence of two forms of sucrose synthetase. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.16, n.4, p.237-240, 1971.
- WOLOSIUK, R.A., PONTIS, H.G. The role of sucrose and sucrose synthetase in carbohydrate plant metabolism. **Mol. Cell. Biochem.**, Hague, v.4, n.2, p. 115-123, 1974.
- ZHAO, M., MOY, J., PAULL, R.E. Effect of gamma-irradiation on ripening papaya pectin. **Postharvest Biol. Technol.**, Amsterdam, v.8, p.209-222, 1996.

7. RESUMO

O metabolismo de carboidratos é, sem dúvida, o regulador do desenvolvimento e amadurecimento dos frutos, devido à translocação do carbono ser feita, principalmente, sob esta forma. Também o sabor doce constitui um dos principais parâmetros de amadurecimento do mamão, juntamente com mudanças de cor e textura. Este trabalho trata do estudo de algumas vias do metabolismo da sacarose durante o amadurecimento do mamão (*Carica papaya* L. cv. Solo), em comparação a frutos submetidos a radiação gama (0,5 KGy), utilizando-se um sistema de batoques que permite acompanhar o amadurecimento de um mesmo fruto. Foram estudadas as enzimas Sacarose Sintase (SS), Sacarose-fosfato Sintase (SPS) e Invertases Ácida e Neutra, diretamente envolvidas no metabolismo da sacarose, além do comportamento dos principais açúcares solúveis, produção de etileno e respiração, e observadas possíveis modificações na composição dos açúcares da parede celular dos frutos. Verificou-se que o sistema de batoques pode ser utilizado com sucesso no acompanhamento do amadurecimento de mamões, sem a ocorrência de sinais de estresse nos frutos. A atividade da SS parece não variar significativamente durante o amadurecimento, enquanto que a SPS apresenta um pico de atividade. A invertase ácida apresenta um aumento brusco de atividade, enquanto a atividade da invertase neutra permanece praticamente constante durante todo o amadurecimento. Os teores de açúcares solúveis totais não se modificam consideravelmente durante o amadurecimento de mamões, mas um decréscimo na quantidade de sacarose por volta do 6º dia após a colheita (dpc), que retorna aos níveis normais em seguida, indica que há síntese de sacarose neste período. Os teores de glicose e frutose permanecem praticamente inalterados. Observa-se uma perda de galactose nos açúcares de parede celular, que não é acumulada no fruto. A respiração e produção de etileno têm um comportamento característico dos frutos climatéricos. A irradiação exerce influência nos parâmetros produção de etileno, e atividades de SPS e de invertases, mas não sobre respiração, metabolismo de açúcares e atividade de SS.

8. ABSTRACT

The carbohydrate metabolism is the major regulator of fruits development and ripening, since the carbon translocation is done in this way. Sweetness also establishes one of the principal ripening controls, associated with changes of color and softness. This work studied part of sucrose metabolism pathway during the papaya fruit ripening, previously irradiated or not. A new system using a bughole method was utilized to follow the ripening process in the same fruit. The enzymes sucrose synthase (SS), sucrose-phosphate synthase (SPS), acid and neutral invertases were studied, and also the major soluble sugars metabolism, ethylene and CO₂ production, and some possible changes in the composition of cell wall sugars. The system using bugholes can be used to follow the ripening of papayas, without causing fruit stress. The SS and neutral invertase activities were practically invariable during the ripening, while SPS showed an activity peak, and the acid invertase activity had an abruptal increase. The total soluble sugars did not change significantly during the ripening of papaya fruits, but a decrease in the sucrose content over the sixth day after harvesting, which returns to the normal level in a few hours, indicated that there is sucrose synthesis at least in this period. The glucose and fructose content remained practically unchanged. There was a loss of galactose from the cell wall, but it was not accumulated in the fruit. The ethylene and CO₂ production showed a typical climateric behaviour. It was demonstrated that irradiation modifies the ethylene production, SPS and acid and neutral invertases, but not CO₂ production, sugar metabolism and SS activities.