

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

CAMILLA ZANOTTI GALON

**ESTUDO DO METABOLISMO FOTOQUÍMICO  
NAS FOLHAS E PERFIL DA ATIVIDADE DA  
CELULASE E  $\beta$ -GALACTOSIDASE NOS  
FRUTOS DE *Carica papaya* L., CULTIVARES  
GOLDEN E GRAN GOLDEN**

VITÓRIA  
2006

CAMILLA ZANOTTI GALON

**ESTUDO DO METABOLISMO FOTOQUÍMICO  
NAS FOLHAS E PERFIL DA ATIVIDADE DA  
CELULASE E  $\beta$ -GALACTOSIDASE NOS  
FRUTOS DE *Carica papaya* L., CULTIVARES  
GOLDEN E GRAN GOLDEN**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal  
Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Diolina Moura Silva

VITÓRIA  
2006

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

G178e Galon, Camilla Zanotti, 1979-  
Estudo do metabolismo fotoquímico nas folhas e perfil da atividade da celulase e  $\beta$ -galactosidase nos frutos de *Carica papaya* L., cultivares Golden e Gran Golden / Camilla Zanotti Galon. – 2006.  
114 f. : il.

Orientadora: Diolina Moura Silva.  
Co-Orientadora: Suely Gomes de Figueiredo.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Fotoquímica. 2. Mamão - Cultivo. 3. Celulase. I. Silva, Diolina Moura. II. Figueiredo, Suely Gomes de. III Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

---

*À minha professora Dil.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me iluminar e abençoar.

A Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal pela oportunidade de realização de mais este curso.

A CAPES e ao Banco do Nordeste pela bolsa de estudos e suporte financeiro para a realização do trabalho.

A Fazenda Herzog pela doação dos frutos e disponibilidade da área para os experimentos de campo.

A minha orientadora por todo o apoio e incentivo à pesquisa científica e por tantos conselhos que me tornaram, sem dúvida, uma pessoa melhor.

A co-orientadora Suely e seus alunos do laboratório de Química de Proteínas por toda a paciência com aquelas benditas enzimas.

Aos professores do Programa pelo cumprimento das disciplinas e aos colegas da Botânica, em especial Sabrina e Mariela, pela mãozinha no trabalho de campo.

Ao Felipe por me acalentar nos momentos de desânimo e estar tão presente na minha vida e, sem dúvida, à sua avó, Dona Iracema, por todos os seus cafezinhos cheios de força.

A minha família, meu pai Durval, minha mãe Suely e minhas irmãs Bina e Mi, por toda confiança e amor.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

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

*T. S. Elliot*

## SUMÁRIO

EXTRATO .....	IX
EXTRACT .....	XI
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
2.1 Panorama atual do cultivo do mamoeiro.....	15
2.2 Características edafoclimáticas da região de cultivo .....	16
2.3 Fisiologia da planta.....	17
2.3.1 Fotossíntese .....	17
2.3.2 Emissão da fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	19
2.3.3 O teste OJIP .....	21
2.4 Fisiologia do fruto.....	25
2.4.1 Amadurecimento .....	25
2.4.2 Constituição da parede celular .....	27
2.4.3 Enzimas de degradação da parede celular envolvidas no amolecimento de frutos .....	32
<b>3. CAPÍTULO 1 – ANÁLISES DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA <i>a</i> EM DUAS CULTIVARES DE MAMOEIRO: GOLDEN E GRAN GOLDEN</b>	
RESUMO .....	36
ABSTRACT .....	38
3.1 INTRODUÇÃO .....	40
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	41
3.2.1 Material vegetal e condição de cultivo .....	41
3.2.2 Avaliação do teor de clorofila total.....	42
3.2.3 Avaliação da fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	43
3.2.4 O teste OJIP .....	43
3.2.5 Análise estatística .....	44
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44



**4. CAPÍTULO 2 - ATIVIDADE DA CELULASE E DA  $\beta$ -GALACTOSIDASE E SUA RELAÇÃO COM A PERDA DE ÁGUA E FIRMEZA DOS FRUTOS DE MAMÃO, CULTIVARES GOLDEN E GRAN**

RESUMO .....	60
ABSTRACT .....	62
4.1 INTRODUÇÃO .....	64
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	66
4.2.1 Coleta dos frutos e amostragem .....	66
4.2.2 Avaliação da perda de água.....	67
4.2.3 Avaliação da firmeza da polpa.....	67
4.2.4 Dosagem protéica e atividade enzimática .....	68
4.2.4.1 Extração de proteínas .....	68
4.2.4.2 Dosagem de proteínas .....	68
4.2.5 Método para os ensaios enzimáticos .....	66
4.2.5.1 Dosagem da atividade da celulase.....	69
4.2.5.2 Dosagem da atividade da $\beta$ -galactosidase .....	70
4.2.6 Análise estatística.....	70
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	71
4.3.1 Perda de água .....	71
4.3.2 Perda de firmeza.....	73
4.3.3 Atividade enzimática na polpa.....	77
4.3.3.1 Celulase .....	77
4.3.3.2 $\beta$ -galactosidase .....	82
<b>5. RESUMO E CONCLUSÕES .....</b>	<b>88</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>

## EXTRATO

Este estudo tratou do metabolismo fotoquímico das folhas e perfil da atividade da celulase e  $\beta$ -galactosidase em frutos de *Carica papaya* L., das cultivares Golden e Gran Golden. Foram feitas medições de teores de clorofila com o medidor portátil de clorofilas (SPAD-502) e da cinética da emissão da fluorescência rápida da clorofila *a* com um fluorômetro portátil, Handy PEA (Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK). As folhas foram previamente adaptadas ao escuro por trinta minutos e em seguida, submetidas a um fluxo de fótons de  $680 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Os dados foram analisados considerando-se as condições de pluviosidade e temperatura da região de cultivo. A curva polifásica da fluorescência da clorofila *a* para ambas as cultivares de mamão no período estudado demonstra que não houve diferença significativa entre as fases O, J, I e P. Foram observadas diferenças nos parâmetros de fluxo de energia por secção transversal do FSII. A cultivar Golden apresentou uma maior taxa de absorção de energia de excitação (ABS/CS), captura de energia de excitação ( $\text{TR}_0/\text{CS}$ ) e transporte dessa energia ( $\text{ET}_0/\text{CS}$ ). Estes resultados sugerem que a cultivar Golden mostrou-se mais eficiente do que a cultivar Gran Golden na utilização da energia luminosa no período em que houve maior precipitação. No entanto, a cultivar Golden também apresentou maior taxa de dissipação de energia ( $\text{DI}_0/\text{CS}$ ) refletida num aumento da fluorescência inicial ( $F_0$ ), considerada um indicativo de estresse em plantas, e, diminuição da eficiência quântica do FSII. A cultivar Gran Golden apresentou um aumento na captura de energia por secção transversal ( $\text{TR}_0/\text{CS}$ ) e transporte dessa energia ( $\text{ET}_0/\text{CS}$ ). Este aumento pode ter contribuído para que a cultivar Gran Golden apresentasse maior eficiência quântica do FSII no período de menor precipitação. As análises dos frutos coletados foram realizadas no Laboratório de Química de Proteínas (UFES). A ação das enzimas celulase e  $\beta$ -galactosidase durante o amadurecimento foi observada durante os 8 dias após a colheita bem

como as análises de firmeza da polpa e perda de água. A porcentagem de perda de água dos frutos foi calculada de acordo com a perda de massa fresca e a perda de firmeza foi obtida com o auxílio de um penetrômetro. A atividade das enzimas celulase e  $\beta$ -galactosidase foram previamente padronizadas para o mamoeiro e então mensuradas para obtenção das correlações com a perda de água e as mudanças de firmeza da polpa. Os resultados mostraram que a maior perda da firmeza nos frutos das cultivares Golden e Gran Golden ocorreu do 3º para o 4º dia após a colheita (dpc) e que os frutos da cv. Gran Golden perderam a firmeza da polpa mais rapidamente do que os frutos da cv. Golden. Estes resultados confirmam as observações visuais já relatadas pelos produtores de mamão, de que os frutos da cv. Gran Golden têm um menor período pós-colheita. Observou-se que a atividade da celulase foi maior no 5º dpc nos frutos da cv. Gran Golden e no 6º dpc nos frutos da cv. Golden. A atividade da  $\beta$ -galactosidase aumentou até o 5º dpc em ambas as cultivares, sendo que na cv. Gran Golden a atividade dessa enzima mostrou-se mais elevada durante o período pós-colheita. Esses resultados mostram a participação dessas enzimas na diminuição da firmeza, mostrando a necessidade de maiores estudos dos fatores que interferem na ativação dessas enzimas a fim de se contribuir para o entendimento da fisiologia do mamão.

## EXTRACT

This study focused the photochemical metabolism of leaves and the pattern of activity of the cellulase and  $\beta$ -galactosidase enzymes in the *Carica papaya* L. fruit, Golden and Gran Golden cultivars. The content of chlorophyll was taken with a portable chlorophyll measuring device (SPAD 502) and the kinetics of the emission of fluorescence from chlorophyll *a* with a portable fluorometer, Handy PEA (Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK). The leaves, after previously going through a thirty minute adjustment to the dark, underwent a flow of photons at  $680 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The amount of rain and the temperature of the area cultivated were taken into account when analyzing the data. The polyphasic curve of the fluorescence of chlorophyll *a* for both cultivars of papaya during the time frame of the study demonstrates that there was not a significant difference among phases O, J, I and P. Differences in the parameters of the energy flow by cross-section of the photosystem II were observed. The Golden cultivar showed a higher rate of absorption of excited energy (ABS/CS), capture of excited energy ( $\text{TR}_0/\text{CS}$ ) and transport of that energy ( $\text{ET}_0/\text{CS}$ ). These results suggest that the Golden cultivar showed more efficiency than the Gran Golden cultivar when utilizing luminous energy in the period with the highest level of precipitation. However, Golden cultivar also showed a higher rate of dissipation of energy ( $\text{DI}_0/\text{CS}$ ) reflected in an increase of initial fluorescence ( $F_0$ ), considered an indication of stress in plants, and the lessening of the quantum efficiency of the photosystem II. The Gran Golden cultivar showed an increase in the capture of energy by cross-section ( $\text{TR}_0/\text{CS}$ ) and the transport of that energy ( $\text{ET}_0/\text{CS}$ ). This increase may have contributed to this cultivar presenting greater quantum efficiency of the photosystem II in the period of lowest precipitation levels. The analysis of the cultivated fruit was conducted in the Laboratory of Protein Chemistry of the Federal University of Espirito Santo (in the

Portuguese acronym, UFES). The action of the enzymes cellulase and  $\beta$ -galactosidase during ripening was observed in the 8 days following harvest and analysis of pulp firmness and loss of water were also conducted. The percentage of water lost in the fruit was calculated according to the loss of fresh mass and the percentage of the loss of firmness was obtained with the aid of a penetrometer. The activities of the enzymes cellulase and  $\beta$ -galactosidase were previously standardized for the papaya tree and then measured for the obtainment of the relation with the loss of water and the changes in the firmness of the pulp. The results showed that the greatest loss in firmness in the fruit of the Golden and Gran Golden cultivars occurred between the 3<sup>rd</sup> and the 4<sup>th</sup> days after the harvest and that the fruit of the Gran Golden cultivar lose pulp firmness faster than those of the Golden cultivar. These results confirm a visual observation reported by papaya growers, and that is that the fruit of the Gran Golden cultivar have a shorter post harvest period. Observation showed that cellulase activity was greatest on the 5<sup>th</sup> day after harvest in the fruit of the Gran Golden cultivar and on the 6<sup>th</sup> day after harvest in the fruit of the Golden cultivar. The activity of  $\beta$ -galactosidase increased in both cultivars until the 5<sup>th</sup> day after harvest, but in the Gran Golden cultivar the activity of this enzyme was higher in the post harvest period. These results illustrate the role these enzymes play in the decrease of firmness, evidencing the need for further study of the factors that interfere in the activation of these enzymes in order to allow the understanding of the physiology of the papaya.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O conhecimento da fisiologia das plantas cultivadas e em particular, do mamoeiro, é um fator de extrema importância, pois possibilita interferir no seu manejo visando melhoria na produtividade e no padrão de qualidade dos frutos. Estas características são dependentes, além dos tratamentos culturais na lavoura, de fatores como luz, temperatura e pluviosidade da região de cultivo.

Neste contexto, o estudo da eficiência quântica do fotossistema II fornece subsídios para a interpretação das respostas do mamoeiro às modificações edafoclimáticas e de manejo da cultura, além de ser uma ferramenta capaz de apontar as diferenças intrínsecas entre cultivares de uma mesma cultura.

O comportamento da planta às adversidades ambientais é determinante para o crescimento do vegetal e para a síntese de compostos orgânicos que constituirão um fruto de melhor qualidade.

Quanto à qualidade, o mamão é avaliado pelas características sensoriais, como sabor, aroma e a firmeza do fruto depois de colhido. Dentre estes fatores, a firmeza da polpa é considerada um atributo de qualidade por estar relacionada à consistência do fruto para o consumo *in natura*, e por interferir na predisposição às injúrias mecânicas durante o manejo pós-colheita. Tanto o mercado interno quanto o externo exigem frutos de melhor aparência e mais firmes para a comercialização.

Para o melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos após a colheita do mamão, tem-se estudado o comportamento das enzimas associadas ao amadurecimento, dentre as quais aquelas envolvidas na degradação da parede celular. O desarranjo na estrutura da parede celular provocado pela ação destas enzimas pode levar à diminuição da firmeza do fruto quando enzimas como a celulase, que atua na estrutura da celulose e

hemicelulose, e a  $\beta$ -galactosidase, que degrada a pectina, atuam sinergicamente.

Assim sendo, levando em consideração que questões fundamentais para o entendimento do metabolismo pré e pós-colheita do mamoeiro ainda não estão por completo esclarecidas, o objetivo deste trabalho foi:

- ⇒ Avaliar a cinética de emissão da fluorescência da clorofila *a* nas cultivares Golden e Gran Golden em resposta às condições de pluviosidade e temperatura.
- ⇒ Avaliar a atividade da celulase e  $\beta$ -galactosidase durante o amadurecimento dos frutos do mamoeiro.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Panorama atual do cultivo do mamoeiro**

O cultivo do mamão é praticado em quase todo o território brasileiro, concentrando-se nos Estados da Bahia, Espírito Santo e mais recentemente no Rio Grande do Norte. O Brasil, depois da China e Índia, é o terceiro maior produtor de frutas do mundo e atualmente ocupa a posição de maior produtor mundial de mamão com produção anual de 1,4 milhões de toneladas em cerca de 30.000 ha, seguido pela Nigéria, México, Índia e Indonésia (BOTEON, 2005).

O mamão é a principal fruta de exportação do Espírito Santo com um volume exportado, em 2004, de quase 70% do volume nacional. O cultivo de mamão emprega cerca de 40.000 pessoas no processo de produção e comercialização, durante todo o ano, apresentando grande importância social (AMARO e CASER, 2003; SEAG, 2005).

As maiores empresas produtoras e exportadoras de mamão do Brasil encontram-se na região norte do Estado do Espírito Santo e exportam tanto para os Estados Unidos quanto para Europa. Embora a Bahia figure como um forte concorrente para o Espírito Santo, é importante ressaltar as vantagens competitivas do Espírito Santo em relação aos pólos de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA), como a localização geográfica estratégica em relação aos mercados de São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte.

Embora o mamão esteja entre as seis frutas mais exportadas pelo Brasil (maçã, banana, manga, uva, mamão e laranja), o volume exportado ainda é pouco significativo, correspondendo a 4,3% do total de frutas exportadas, sendo que apenas 2% do que o País produz de mamão é para exportação (ANDRIGUETO e KOSOSKI, 2005).



Na região de Linhares, ao norte do Espírito Santo, dentre as variedades cultivadas estão a Golden e Gran Golden, cultivares de maior aceitação no mercado externo (BRAPEX, 2005).

Frente à importância do mamoeiro para o Estado do Espírito Santo é fundamental a geração de conhecimento nas diferentes áreas visando a adaptação de tecnologias para, sobretudo, obter melhor qualidade e conservação dos frutos e reduzir as perdas pós-colheita.

## **2.2 Características edafoclimáticas da região de cultivo**

O mamoeiro é uma planta que extrai quantidades relativamente altas de nutrientes do solo e apresenta exigências contínuas durante o primeiro ano. A sua característica de colheitas intermitentes a partir do início de produção mostra que a planta necessita de suprimentos de água e nutrientes em intervalos freqüentes de modo a permitir o fluxo contínuo de produção de flores e frutos (COELHO e OLIVEIRA, 2003).

Por ser uma planta exigente em relação às condições de clima e solo, o mamoeiro desenvolve-se melhor em locais de boa luminosidade, com temperaturas entre 21 e 33°C, com níveis de precipitação acima de 1.200 mm anuais e não tolera excesso de umidade no solo. Segundo Marin et al. (1995), o solo areno-argiloso é o mais indicado para o plantio apesar desse tipo de solo apresentar baixa capacidade de armazenamento de água.

O solo da região produtora de mamão, no norte do Espírito Santo, apresenta pequena capacidade de armazenamento de água de forma que a má-distribuição das chuvas obriga o uso da irrigação nas lavouras comerciais do mamoeiro. O déficit hídrico ao qual as plantas estão

expostas, em conjunto com a evapotranspiração provocada pelo aumento da temperatura exige o uso de sistemas de irrigação.

## **2.3 Fisiologia da planta**

### **2.3.1 Fotossíntese**

A fotossíntese é o único processo biológico capaz de coletar a energia fornecida pelo Sol para a utilização em processos metabólicos. Os organismos fotossintéticos utilizam essa energia solar para sintetizar compostos orgânicos. A energia armazenada nestes compostos pode ser usada posteriormente nas reações celulares das plantas, servindo também como fonte de energia para todas as demais formas de vida (KERBAUY, 2004).

O mesofilo celular é o tecido de maior atividade fotossintética em plantas superiores, pois contém os cloroplastos, organelas ricas em pigmentos especializados na absorção de luz. No cloroplasto, o estroma contém as enzimas que convertem o  $\text{CO}_2$  em carboidratos, enquanto que, nos tilacóides, estão os pigmentos cloroplastídicos. Nos tilacóides, a energia solar é utilizada para oxidar a molécula de água e formar trifosfato de adenosina (ATP) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), compostos ricos em energia, necessários no estroma para converter  $\text{CO}_2$  em carboidratos.

Em certas partes dos cloroplastos, há pilhas de tilacóides chamados grana (singular granum). A região do granum onde um tilacóide entra em contato com outro é chamada de região de depressão ou vale, onde se encontram os polipeptídeos do fotossistema II (FSII). Nas lamelas, localizam-se os polipeptídeos do fotossistema I (FSI) e o complexo  $\text{ATP}_{\text{sintase}}$ .

O fotossistema II (FSII) consiste de vários polipeptídeos e contém o centro de reação  $P_{680}$  que atua como doador primário de elétrons ( $P_{680}$  é uma forma especial de clorofila *a* que absorve a luz num comprimento de onda de 680 nm) (LIU et al., 2004). O FSII possui um complexo antena coletor de luz, LHCII ("Light Harvesting Complex") e um complexo de oxidação da molécula de água, CEO (Complexo de Evolução de Oxigênio). A Figura 1 mostra um resumo das etapas envolvidas no transporte de elétrons, conhecido como Esquema Z.

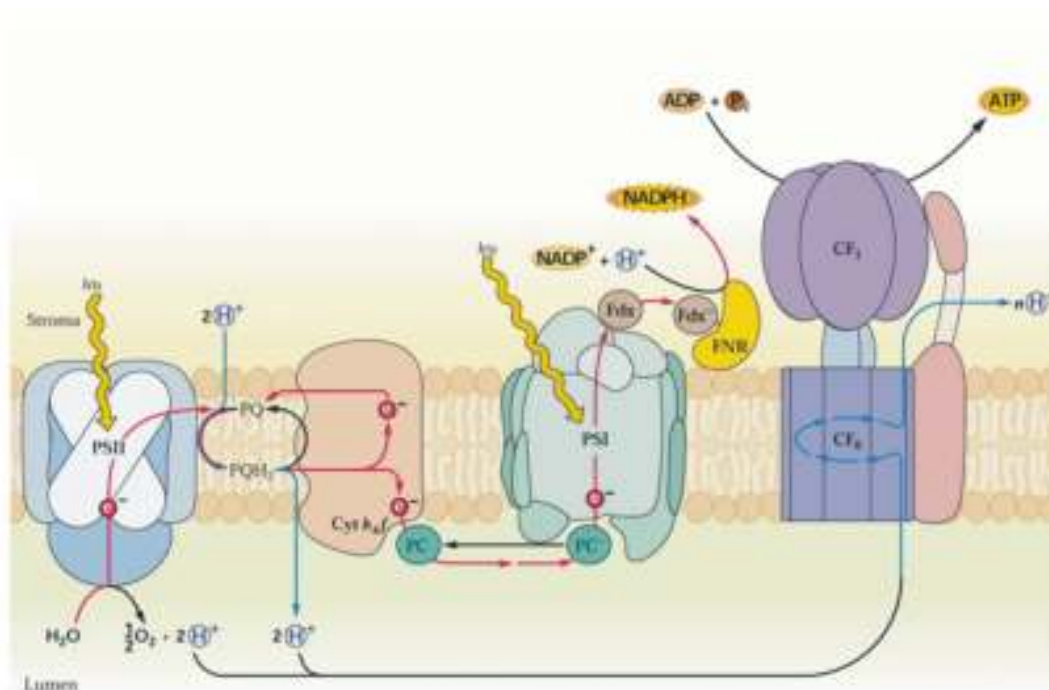


Figura 1-Esquema geral das reações fotoquímicas exibindo os complexos do FSII, citocromo  $b_{6f}$ , FSI e  $ATP_{\text{ sintase}}$  e a transferência de elétrons (BUCHANAN et al., 2000).

### 2.3.2 Emissão da fluorescência da clorofila *a*

A relação inversa entre fluorescência e atividade fotossintética foi primeiramente descrita por Kautsky (1941), que observaram que o tecido fotossintético, após um período de adaptação ao escuro, apresenta modificações características na intensidade da fluorescência da clorofila *a* quando iluminado com luz contínua. Essas mudanças chamadas de indução da fluorescência, ou, "efeito Kautsky" compreendem duas etapas: uma rápida que ocorre a partir do primeiro segundo de emissão de luz e outra lenta que ocorre a partir de um segundo até a estabilização da fluorescência com cerca de 3 minutos de duração, alcançando um estado de equilíbrio ou "steady state".

Nos últimos trinta anos diversos trabalhos apontaram que a emissão de fluorescência fornece informações sobre processos fotoquímicos do FSII (STRASSER, 1978, 1981; STRASSER et al., 1992, LICHTENTHALER et al., 1992; SRIVASTAVA et al., 1997, 1999). Sob condição de baixa irradiância, ao redor de 95% dos fótons absorvidos são usados na etapa fotoquímica, 4,5% são transformados em calor e 0,5% são re-emitidos como luz fluorescente (BOLHÀR-NORDENKAMPF e ÖQUIST, 1993). A fluorescência é, portanto, a emissão de uma pequena porção da energia absorvida e não utilizada nas reações fotoquímicas da fotossíntese e funciona como um mecanismo protetor contra estresse luminoso (GILMORE e BJORKMAN, 1994).

Existe uma extensa opção de sinais da fluorescência utilizada na interpretação das variáveis do processo fotossintético (KRAUSE e WEIS, 1991; MAXWELL e JOHNSON, 2000; BAKER e ROSENQVIST, 2004). Os sinais básicos de maior emprego são a fluorescência inicial ( $F_0$ ), a fluorescência máxima ( $F_M$ ), a fluorescência variável ( $F_v = F_M - F_0$ ), e a razão  $F_v/F_M$ .

Em uma folha adaptada ao escuro, a exposição imediata à luz induz ao aumento na fluorescência a partir de um nível mínimo, chamado de fluorescência inicial ( $F_0$ ), quando os centros de reações do FSII estão no estado "aberto", isto é, quando a plastoquinona  $Q_A$ , receptor primário de elétrons, está totalmente oxidada. De acordo com Bolhàr-Nordenkampf e Öquist (1993), Strasser et al. (1995), Baker e Rosenqvist (2004), quando toda  $Q_A$  estiver reduzida à  $Q_A^-$  pelos elétrons transferidos a partir do  $P_{680}$ , a energia absorvida será dissipada como fluorescência máxima ( $F_M$ ) e os centros de reação do fotossistema estarão "fechados". Para Georgieva e Yordanov (1993) a fluorescência variável ( $F_V$ ) se origina da população de pigmentos do FSII e se mostra sensível à taxa de transporte de elétrons através dos centros de reação e às mudanças na ultraestrutura da membrana do tilacóide.

A razão entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima ( $F_V/F_M$  ou  $\phi_{Po}$ ) fornece uma estimativa da eficiência quântica máxima do mecanismo fotoquímico do FSII e tem sido empregada na detecção de perturbações no aparelho fotossintético induzidas por estresse ambiental (KRAUSE e WEIS, 1991; COSTA et al., 2002; GOLÇALVES et al., 2005; STRAUSS et al., 2005).

Trabalhos recentes têm evidenciado o comportamento fotossintético do mamoeiro e, mais especificamente sua sensibilidade às condições de estresse a que está submetido. Campostrini et al. (2003) e Gomes et al. (2003), observaram que os valores máximos de  $F_V/F_M$  obtidos em plantas de mamoeiro cultivadas na região norte do Estado do Espírito Santo, não ultrapassaram 0.75, valor abaixo do ideal para a maioria das espécies vegetais (RIBEIRO et al., 2003). O efeito da baixa disponibilidade de água para o mamoeiro foi relatado por Castro (2004), quando as cultivares Sunrise Solo e Golden apresentaram um decréscimo na razão  $F_V/F_M$ . Chama a atenção também as diferenças intergenotípicas do mamoeiro quando sob condições de estresse. Por exemplo, Fontes (2005), ao investigar os efeitos do estresse hídrico, nas cultivares Sunrise Solo e

Tainung, observou que a cultivar Tainung mostrou-se mais sensível às variações na temperatura da região de cultivo, reduzindo sua eficiência fotoquímica, enquanto que as plantas da cultivar Sunrise Solo mostraram-se mais sensível às variações na pluviosidade.

### **2.3.3 O teste OJIP**

A interpretação dos sinais de fluorescência em estudos para a avaliação dos efeitos ambientais (temperatura, luminosidade, disponibilidade de água, etc.) sobre o funcionamento do aparelho fotossintético tem evoluído bastante (SCHREIBER, 1983; GOVINDJEE, 1995; STRASSER, 1997; STRAUSS, 2005).

Trabalhos realizados por Strasser (1978, 1981) permitiram a formulação de uma teoria baseada no fluxo de elétrons envolvido no aparelho fotossintético. O autor propôs que a fluorescência do FSII ocorre na antena e no centro de reação separadamente (Figura 2). A energia (fluxo de fótons) absorvida pelos pigmentos antena (ABS) pode ser dissipada, na forma de calor ou emissão de fluorescência e outra parte pode ser canalizada como um fluxo de captura ( $TR_o$ ) para o centro de reação (RC). Esta energia será convertida em energia "redox" pela redução do acceptor de elétrons  $Q_A$  em  $Q_A^-$ , a qual é então reoxidada à  $Q_A$ , criando, portanto um transporte de elétrons (ET) que culmina, finalmente, na fixação de  $CO_2$ .

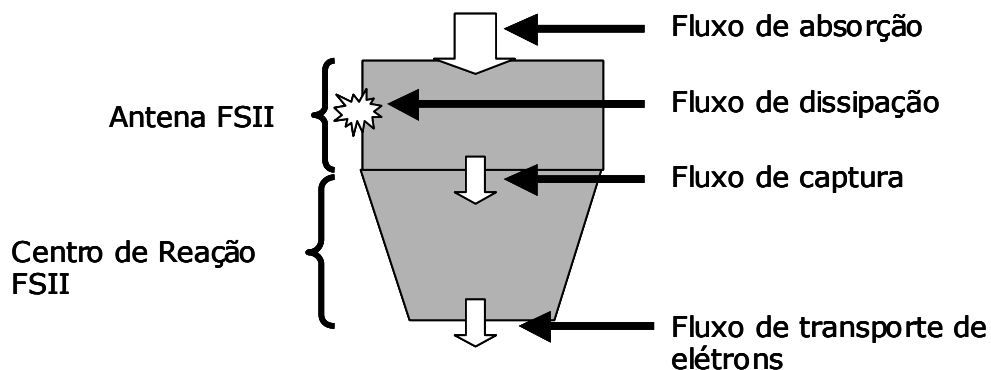


Figura 2 – Modelo de fluxo de energia no aparelho fotossintético, baseado na teoria de fluxo de energia proposto por Strasser (1978, 1981).

A partir da teoria do fluxo de elétrons, Strasser e Strasser (1995), propuseram um teste que traduz as modificações observadas nas etapas da fluorescência, em mudanças quantitativas. Essas análises quantitativas foram chamadas de teste OJIP e podem ser usadas para explicar o fluxo de energia através do FSII em nível de secção transversal (CS) ou área foliar no FSII assim como em nível do centro de reação (RC).

As etapas do fluxo de energia através do FSII, em nível de secção transversal (CS), compreendem as razões  $ABS/CS$  (absorção da energia),  $TR_0/CS$  (captura da energia),  $ET_0/CS$  (transporte de energia) e  $DI_0/CS$  (dissipação da energia).

Essas razões exprimem mudanças qualitativas em nível de secção transversal do FSII sendo que,  $ABS/CS$  mostra o número de fótons absorvidos pelas moléculas antena dos centros de reação ativos e inativos do FSII por secção transversal amostrada. Pode ser representado pelo valor de  $F_0$  ou etapa O da curva OJIP, sendo a intensidade da fluorescência aos  $50 \mu s$ . O parâmetro  $TR_0/CS$  mostra a taxa máxima de captura da energia de excitação por secção transversal de um centro de reação ativo, capaz de reduzir  $Q_A$  ( $Q_A \rightarrow Q_A^-$ ). O parâmetro  $ET_0/CS$  indica a reoxidação de  $Q_A^-$  ( $Q_A^- \rightarrow Q_A$ ) via transporte de elétrons por secção transversal de um centro de reação ativo e inativo. O parâmetro  $DI_0/CS$

mede a dissipação total de energia por secção transversal do FSII que contém centros de reação ativos e inativos. A dissipação ocorre na forma de calor, fluorescência ou transferência de energia para outros sistemas. O número de centros de reação por secção transversal amostrada no FSII é representado por RC/CS.

Os parâmetros listados acima são inter-relacionados e definem a probabilidade da captura de energia absorvida (TR/ABS) e do transporte de energia capturada (ET/TR) no FSII. TR/ABS, também demonstrada pela razão  $F_V/F_M$ , representa a probabilidade de que um fóton absorvido será capturado pelo centro de reação do FSII resultando na redução de  $Q_A$  ( $Q_A \rightarrow Q_A^-$ ). E a razão ET/TR representa a probabilidade de que um elétron da  $Q_A^-$  passará para a cadeia transportadora de elétrons.

Ao se plotar os dados acima listados obtidos da fluorescência numa escala de tempo logarítmica obtém-se a curva OJIP, composta pelas etapas O-J, J-I e I-P. Quando a folha adaptada ao escuro sofre iluminação, ocorre um aumento polifásico na cinética da fluorescência rápida. Através da curva OJIP é possível se quantificar o funcionamento do FSII. Uma típica curva OJIP é mostrada na Figura 3.



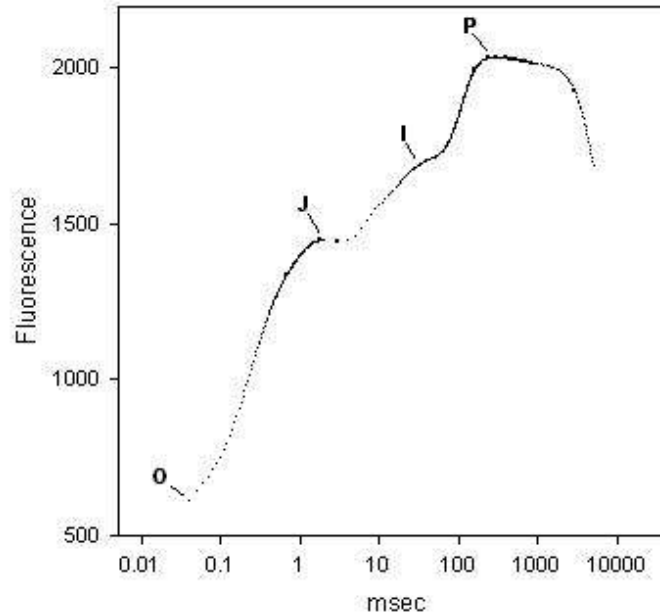


Figura 3- Etapas subseqüentes à indução da fluorescência da clorofila *a* em folhas adaptadas ao escuro que compõem a curva OJIP. Adaptado de Sinsawat (1999).

A etapa J ocorre aos 2 ms após a iluminação e a etapa I ocorre aos 30 ms entre o início O (que ocorre aos 50  $\mu$ s) também chamado de fluorescência inicial,  $F_o$ , e o nível máximo P, chamado de fluorescência máxima,  $F_p$  ou  $F_M$  (STRASSER e GOVINDJEE, 1992; LICHTENTHALER et al., 2005).

O teste OJIP tem sido usado para investigações do comportamento *in vivo* do aparelho fotossintético, uma vez que a sensibilidade das curvas da fluorescência rápida pode indicar estresse causado por mudanças ambientais (STRASSER et al., 2000).

Muitos estudos têm usado somente a razão obtida entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima ( $F_v/F_M$ ) como parâmetro para avaliar tolerância ao estresse ambiental (BERTIN, 1996; FRACHEBOUN et al., 1999). No entanto algumas evidências indicam que os parâmetros quantitativos obtidos da análise do fluxo de energia devem ser considerados, além da razão  $F_v/F_M$  (HALDIMANN e STRASSER, 1997; FORCE et al., 2003).

Van Heerden et al. (2003, 2004), por exemplo, demonstraram que a razão  $F_V/F_M$  não foi um parâmetro sensível para a seleção de genótipos de soja tolerantes ao frio, uma vez que não houve diferença significativa na razão  $F_V/F_M$ . Porém o frio levou à diminuição da capacidade de transporte de elétrons, indicado pela intensidade da fluorescência na etapa J das curvas da fluorescência rápida. Enquanto que Force et al., (2003), demonstraram a vantagem de se usar o teste de OJIP para avaliar o funcionamento do FSII ao invés de somente o parâmetro  $F_V/F_M$ , por ser capaz de quantificar as etapas do fluxo de energia através do FSII tanto em nível de centro de reação (RC) quanto em nível de secção transversal do FSII (CS).

## **2.4 Fisiologia do fruto**

### **2.4.1 Amadurecimento**

A formação de um fruto compreende várias etapas que levam ao crescimento das células durante o desenvolvimento seguindo com sua maturação e posterior senescência em função dos processos fisiológicos (WATADA et al., 1984).

O amadurecimento está associado com modificações no metabolismo de açúcares, degradação de clorofilas e acúmulo de pigmentos e é uma fase importante no desenvolvimento dos frutos, pois os tornam palatáveis em função das alterações de firmeza, sabor, cor e compostos aromáticos (CHITARRA e CHITARRA, 1990; BROWNLEADER et al., 1999).

Quanto ao padrão respiratório, os frutos podem ser divididos em climatéricos e não-climatéricos. Esta classificação é importante para definir técnicas de colheita e armazenamento que podem prolongar o tempo de armazenamento do fruto (ARCHBOLD e POMPER, 2003).

Na Figura 4 observa-se o aumento característico na respiração de frutos climatéricos. São considerados frutos climatéricos aqueles em que o amadurecimento é acompanhado por um aumento característico da atividade respiratória concomitante com o aumento do hormônio etileno (ALEXANDER e GRIERSON, 2002). Esse aumento na atividade respiratória coincide com uma aceleração no processo de amadurecimento (TUCKER e GRIERSON, 1987; ABELES et al., 1992; MOYA-LEÓN et al., 2004).

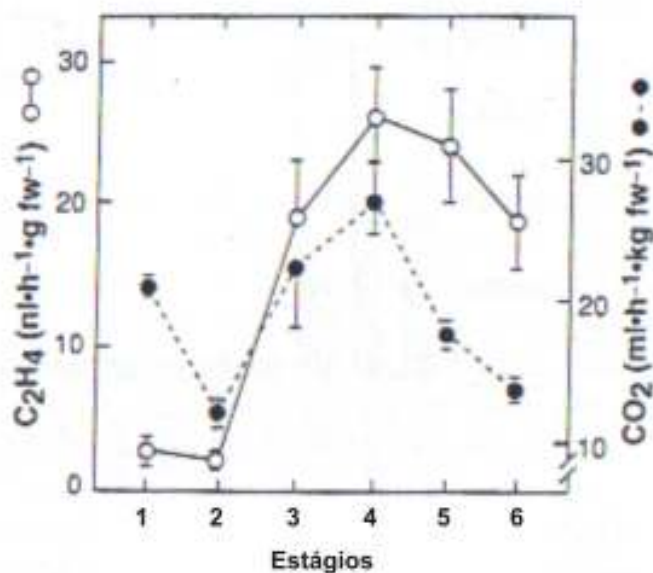


Figura 4 – Padrão respiratório climatérico exibindo o aumento na liberação de CO<sub>2</sub> com a liberação de etileno durante as fases de amadurecimento de frutos de tomate. Adaptado de Srivastava, 2002.

Em frutos climatéricos, a regulação da expressão gênica relacionada ao amadurecimento é diferente de frutos não-climatéricos (BRUMMELL e HARPSTER, 2001). Tomate, maçã, banana e mamão, são exemplos de frutos climatéricos que apresentam um aumento na taxa de síntese de etileno, antes do aumento respiratório (PAULL, 1983; BROWNLEADER et al., 1999; JACOMINO et al., 2003).

Os frutos classificados como não-climatéricos não apresentam o aumento da atividade respiratória durante o amadurecimento e os níveis de etileno permanecem baixos. O amadurecimento só ocorre se o fruto estiver aderido à planta, diferentemente dos frutos climatéricos que possuem a capacidade de amadurecer mesmo após a colheita (WILLS et al., 1998; GIOVANNONI, 2001).

Segundo Huber (1983), a liberação de etileno leva à indução da expressão gênica de proteínas envolvidas em modificações no metabolismo de carboidratos e da parede celular.

#### **2.4.2 Constituição da parede celular**

A parede celular é uma estrutura extremamente dinâmica, sendo portanto, capaz de modificar-se em diferentes estádios do desenvolvimento da planta (BRETT e WALDRON, 1996; CAMPBELL e BRAAM, 1999). A interação entre os componentes da parede celular é um importante fator que determina a integridade, elasticidade e propriedades mecânicas da estrutura da parede e é essencial aos processos fisiológicos e de desenvolvimento das plantas, com funções de suporte estrutural às células; proteção contra ação de patógenos e desidratação; armazenamento de mensageiros celulares, carboidratos e outros compostos (COSGROVE, 1999; CARVALHO, 2001).

A parede celular é sintetizada em várias camadas que são a lamela média, a parede celular primária e a parede celular secundária. A lamela média é a primeira camada formada e é depositada durante a divisão celular. A parede celular primária é a próxima camada a ser formada e é continuamente depositada durante o crescimento em área da célula. A última camada a ser sintetizada é a parede celular secundária e é depositada por células especializadas (vasculares, epidérmicas e de fibras

lenhosas da madeira), composta principalmente de celulose e lignina que conferem estabilidade mecânica às células (GIBEAUT e CARPINA, 1994; BRETT e WALDRON, 1996; REITER, 2002).

As células presentes na polpa dos frutos contêm apenas a parede celular primária. Esta compreende duas fases básicas denominadas fase microfibrilar e matriz. A fase microfibrilar é constituída de microfibrilas de celulose e constitui o maior arranjo da parede celular e a matriz é constituída de polissacarídeos não celulósicos, fenólicos e proteínas (BROWNLEADER et al., 1999).

De acordo com Selvendran (1983), a parede celular primária é constituída de 30 a 60% de celulose, 15 a 45% de substâncias pécticas, 15 a 25% de hemiceluloses e 10 a 15% de proteínas. O conjunto de hemiceluloses, substâncias pécticas e proteínas formam uma matriz gelatinosa na qual as microfibrilas de celulose estão inseridas. Para a organização da parede celular, Keegstra et al., (1973) citado em Cosgrove (2000, 2001), propôs que os polímeros da matriz, consistindo de xiloglicanos, polissacarídeos pécticos, e proteínas estruturais, estão covalentemente ligados formando uma grande rede macromolecular. Neste modelo, a celulose liga-se à matriz via ligações de hidrogênio com os xiloglicanos (Figura 5).

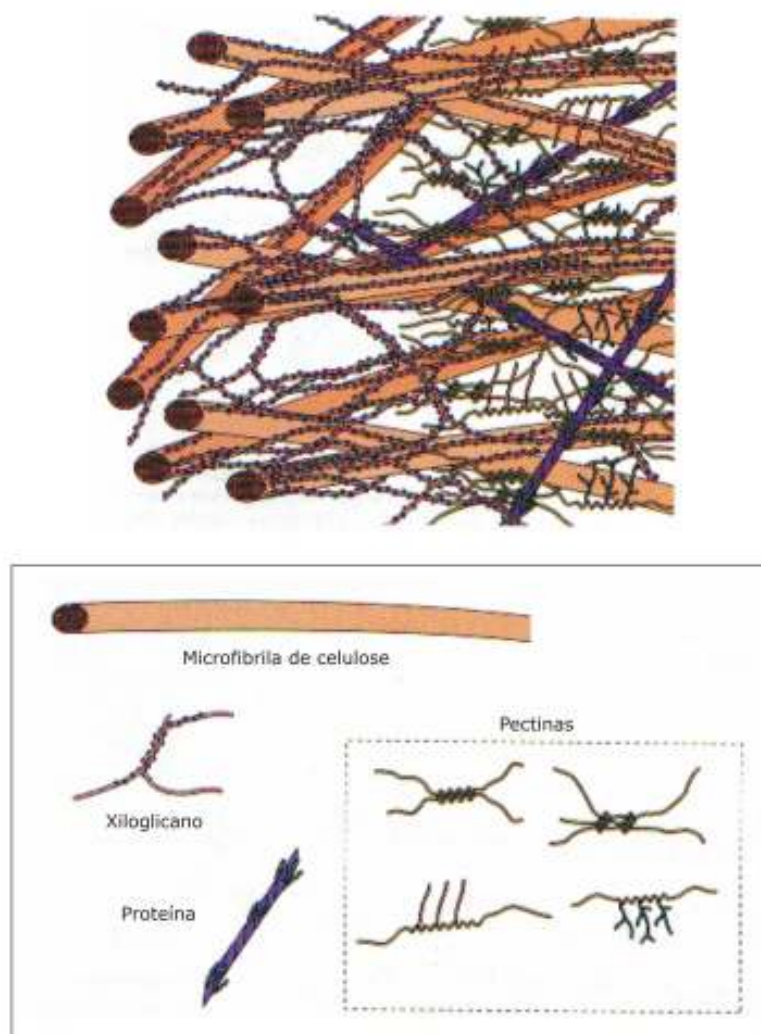


Figura 5 – Modelo tridimensional da parede celular mostrando as interações entre as microfibrilas de celulose, hemiceluloses (representadas pelos xiloglicanos), pectinas e proteínas (Adaptado de Buchanan et al., 2000).

A celulose consiste de uma cadeia linear de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 (Figura 6). As cadeias de celulose se interligam por ligações covalentes formando as microfibrilas (BARTLEY e KNEE, 1982).

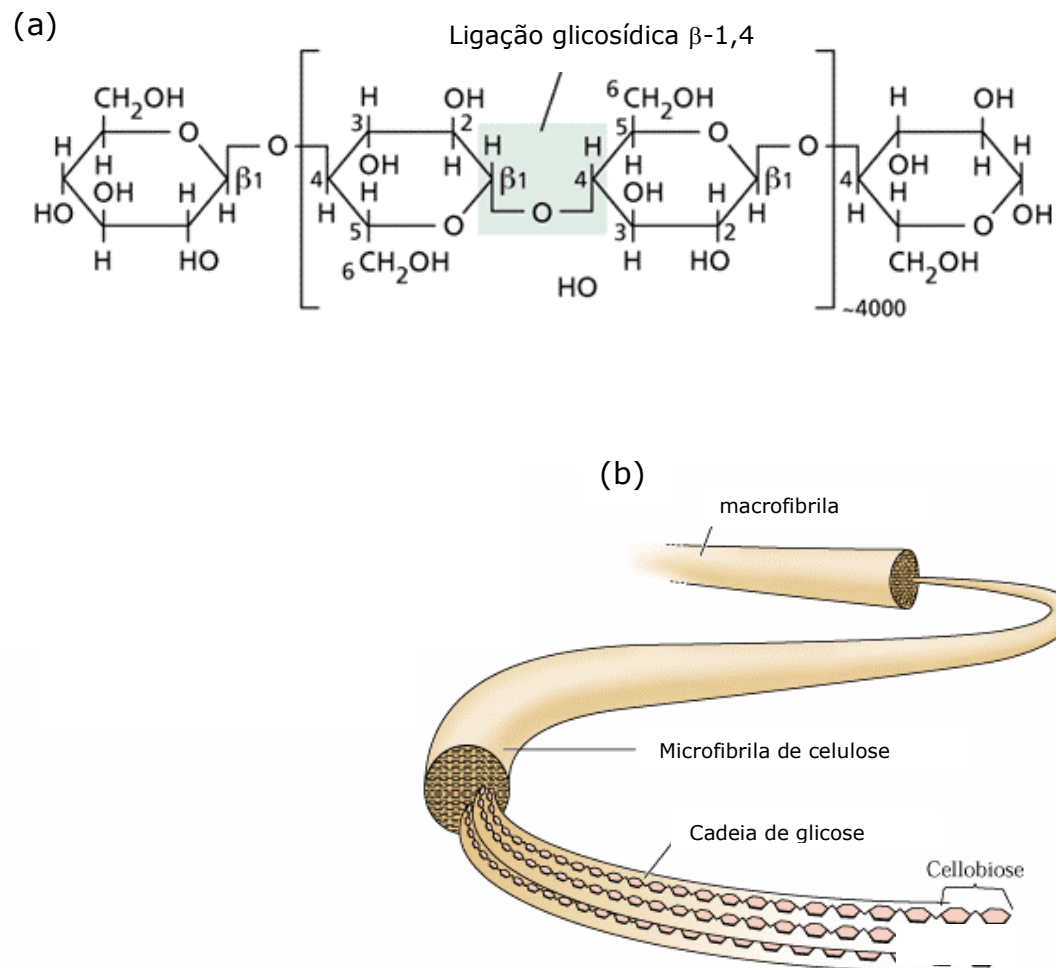


Figura 6 – Celulose. (a) ligação glicosídica do tipo  $\beta$ -1,4 na estrutura química da celulose. (b) organização da celulose em microfibrilas compostas de cadeias de glicose (Adaptado de Buchanan et al., 2000).

A hemicelulose faz parte da matriz e é constituída de glicanos com três resíduos consecutivos de xilose  $\alpha$ -1,6, tendo como principal constituinte os xiloglicanos. A hemicelulose se liga às microfibrilas de celulose e ao material péctico formando uma estrutura em gel (JARVIS, 1984; DELMER e AMOR, 1995; REITER, 2002).

Pectina é um termo genérico designado para um grupo de polissacarídeos de estrutura coloidal localizados na parede celular primária e na lamela média de plantas superiores (ROLIN et al., 1998; KASHYAP et al, 2001; STRASSER et al., 2001). A pectina forma uma estrutura de proteção da integridade da célula e, assim como os polímeros celulose e hemicelulose, é responsável pelas propriedades estruturais da polpa dos frutos (OECHSLIN et al., 2003).

As pectinas apresentam uma cadeia principal composta de resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 (KASHIAP, 2001), podendo apresentar em sua estrutura ramificações de resíduos de ramnose, arabinose, galactose e xilose.

Os grupos carboxílicos do ácido poligalacturônico ligam-se ao íon cálcio, formando a protopectina, predominante nos tecidos imaturos. Com o amadurecimento do fruto, há a solubilização das protopectinas da lamela média e liberação do cálcio levando ao enfraquecimento das ligações dos polissacarídeos da parede pelo deslocamento dos íons de cálcio das zonas de junção (SOLE e BÖTTGER, 1981; KONNO et al., 2002) (Figura 7).



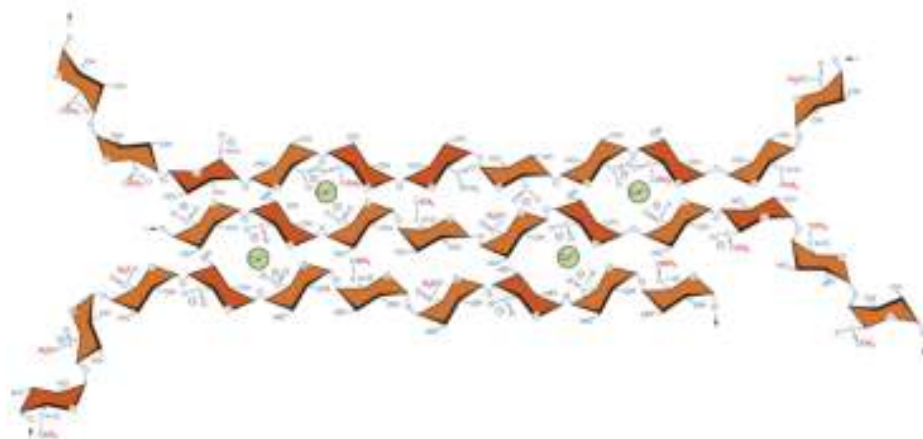


Figura 7 - Representação esquemática da estrutura química do ácido poligalacturônico esterificado com cálcio, exibindo os radicais metil (-CH<sub>2</sub>) e as ligações iônicas de carboxilatos não-esterificados (R-COO<sup>-</sup>). Adaptado de Buchanan et al., 2000.

A coesão dos componentes da parede celular é um importante fator que determina a firmeza do fruto. Eventos como o amolecimento do fruto durante o período de amadurecimento é resultante da redução na adesão célula a célula, causada pela dissolução da lamela média rica em pectina e a desestruturação da parede celular primária (CROOKES e GRIERSON, 1983). O amadurecimento geralmente é acompanhado por redução no turgor celular, devido ao aumento das concentrações dos solutos entre os espaços intercelulares e à desorganização da parede celular (SACKEL et al., 1991).

### **2.4.3 Enzimas de degradação da parede celular envolvidas no amolecimento de frutos**

O amolecimento de frutos durante o amadurecimento é principalmente atribuído à atividade de enzimas que degradam os polissacarídeos da parede celular. Rose e Bennett (1999), acreditam que a perda de turgor contribui para o amadurecimento de frutos e que modificações catalisadas por enzimas sobre a estrutura e composição da parede celular são consideradas o maior fator do amolecimento de frutos. Lajolo e Cordenunsi (2002), sugerem que os carboidratos são liberados durante o amadurecimento de mamão resultante da degradação da parede celular nesse período. O hormônio etileno é o ativador destas enzimas responsáveis pelas modificações na parede celular durante o amadurecimento (HUBER, 1983; WAKABAYASHI, 2000).

Segundo Karakurt e Huber (2002), a aplicação de etileno em frutos climatéricos induz ao acúmulo de hidrolases da parede celular. Em frutos de abacate, a atividade da celulase (TUCKER e LATIES, 1984) e da poligalacturonase em tomate (BIGGS et al., 1986) são transcricionalmente reguladas pelo etileno. Em banana, as hidrolases pectina metil esterase, poligalacturonase, celulase e pectato liase são grandemente dependentes da produção e percepção do etileno nos tecidos do fruto durante o amadurecimento (LOHANI et al., 2004).

Entre as enzimas que degradam a parede celular, pode-se mencionar as enzimas pectinolíticas, incluindo aquelas que catalisam a quebra hidrolítica do ácido poligalacturônico (endo ou exo-poligalacturonase) e polímeros de galactose ( $\alpha$  ou  $\beta$ -galactosidase). Outra enzima importante nesse processo é a pectinametilsterase (PME) que remove os grupamentos metila dos resíduos do ácido poligalacturônico esterificados. Atuam ainda degradando a parede celular, enzimas que agem nas hemiceluloses (como xiloglucanases e xilogucano endotransglicosilases) e aquelas que atuam nos polímeros de celulose, conhecidas como celulases (HAGERMAN e

AUSTINN, 1986; KETSA e DAENKANIT, 1999; MANRIQUE e LAJOLO, 2004).

As galactosidases (E.C. 3.2.1.23) são enzimas glicosídicas que catalisam a quebra dos compostos contendo O-galactosil e constituem um grupo de glicosidases que catalisam a clivagem hidrolítica de resíduos terminais de D-galactose em ligação  $\alpha$  ou  $\beta$ , sendo consideradas  $\alpha$ -galactosidases e  $\beta$ -galactosidases. A  $\beta$ -galactosidase hidrolisa os polímeros da parede com ligações  $\beta$ -1,4 em galactanos e arabinogalactanos (BALASUBRAMANIAM et al., 2005). Koh e Melton (1994), relataram um aumento no conteúdo de carboidratos solúveis durante o amadurecimento de frutos, resultante da despolimerização de pectinas e encontraram que o principal componente dos açúcares neutros foi galactose.

As  $\beta$ -galactosidases associadas ao amadurecimento têm sido purificadas e parcialmente caracterizadas a partir de frutos como o tomate (CAREY et al., 1995), maçã (ROSS, et al., 1994), abacate (de VEAU et al., 1993) e mamão (ALI et al., 1998). Esta enzima ocorre em múltiplas formas e é codificada por muitos genes (SOH, 2002). Em carambola, a  $\beta$ -galactosidase também está relacionada à degradação de hemiceluloses e pectina (CHIN et al., 1999). LAZAN et al. (2004), relataram que, em mamão, as enzimas de degradação de parede celular são glicoproteínas com atividade significativa de  $\beta$ -galactanase, entre elas está a  $\beta$ -galactosidase.

As celulases também conhecidas como endo 1,4-  $\beta$ -D glicanases (EGase, EC 3.2.1.4) (FISCHER e BENNETT, 1991; SEXTON e PALMER, 1997) também contribuem para a perda da firmeza da polpa do fruto. As ligações  $\beta$ -(1,4)-D-glicosil que ocorrem nas microfibrilas de celulose podem ser clivadas pelas celulases, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose.

O aumento da atividade da celulase foi inicialmente observado em manga (ABU-SARRA e ABU-GOUKH, 1992) e abacate (PESIS et al., 1978). El-

Zoghbi (1994), após avaliar a atividade desta enzima durante o amadurecimento destes frutos, concomitantemente com o declínio do conteúdo da celulose, sugeriu sua participação no amolecimento de frutos.

Em manga, a atividade da celulase (EC 3.2.1.4) e da  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) aumenta com o amadurecimento, contribuindo na modificação da celulose. Esse aumento é associado ao aumento da solubilidade e despolimerização das pectinas da parede celular (ALI et al., 1998).

Prabha e Bhagyalakshmi (1997) registraram um aumento na atividade de várias hidrolases de carboidratos, como poligalacturonase, pectina metil esterase,  $\beta$ -galactosidase e celulase no estágio climatérico de amadurecimento de banana, acompanhada da perda da integridade da parede celular, diminuição da parede celular e aumento dos espaços intercelulares. Estudos das alterações na atividade das enzimas de degradação da parede celular em alguns cultivares de manga também têm sido relatados (ABU-SARRA e ABU-GOUKH, 1992).

Constata-se que dentre os inúmeros estudos relatados acima, a participação da celulase e da  $\beta$ -galactosidase no amolecimento do fruto de mamão merece atenção dos pesquisadores uma vez que o papel destas enzimas durante o processo de amadurecimento ainda não está completamente esclarecido.

### 3. CAPÍTULO 1

## ANÁLISES DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* EM DUAS CULTIVARES DE MAMOEIRO: GOLDEN E GRAN GOLDEN

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento da fluorescência da clorofila *a* em folhas de mamoeiro (*Carica papaya* L.), cultivares Golden e Gran Golden, levando-se em consideração as condições de pluviosidade e temperatura da região de cultivo. As medidas de teores de clorofila foram realizadas com o medidor portátil de clorofilas, SPAD-502, e dados para o estudo da fluorescência rápida da clorofila foram obtidos com o auxílio de um fluorômetro portátil, Handy PEA (Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK). As folhas do mamoeiro foram mantidas no escuro por trinta minutos para em seguida se emitir um fluxo de fótons na intensidade de  $680 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A curva polifásica da fluorescência da clorofila *a* para ambas as cultivares de mamão no período estudado demonstra que não houve diferença significativa entre as fases O, J, I e P. No entanto, foram observadas diferenças no fluxo de energia por secção transversal do FSII. Os parâmetros analisados do fluxo de energia mostraram que a cultivar Golden apresentou uma maior taxa de absorção (ABS/CS), captura de energia ( $\text{TR}_0/\text{CS}$ ) e transporte de energia ( $\text{ET}_0/\text{CS}$ ). Estes resultados sugerem que a cultivar Golden mostrou-se mais eficiente do que a cultivar Gran Golden na utilização da energia luminosa no período em que houve maior precipitação. No entanto, esta cultivar também apresentou maior taxa de dissipação de energia ( $\text{DI}_0/\text{CS}$ ), o que possivelmente refletiu num aumento da fluorescência inicial ( $F_0$ ), considerada um indicativo de estresse em plantas. Como consequência, houve uma diminuição da eficiência quântica do FSII nesse período. A

cultivar Gran Golden apresentou um aumento na captura ( $TR_o/CS$ ) e transporte de energia ( $ET_o/CS$ ) quando houve diminuição das chuvas. O aumento em  $TR_o/CS$  e  $ET_o/CS$  pode ter contribuído para que esta cultivar apresentasse maior eficiência quântica do FSII no período de menor precipitação. De acordo com os resultados obtidos pode-se inferir que as variações de precipitação influenciam a eficiência da utilização da energia luminosa absorvida pelas clorofilas em plantas do mamoeiro.

## CHAPTER 1

**ANALYSIS OF THE CHLOROPHYLL *a* FLUORESCENCE IN TWO PAPAYA CULTIVARS: GOLDEN AND GRAN GOLDEN**

## ABSTRACT

The goal of this study was to evaluate the behavior of the chlorophyll *a* fluorescence in leaves of the papaya tree (*Carica papaya* L.), cultivars Golden and Gran Golden, taking into account the amount of rain and the temperature of the area where they were cultivated. The levels of chlorophyll were taken with a portable chlorophyll measuring device, SPAD 502, and data for the study of fast fluorescence of chlorophyll was gathered with the aid of a portable fluorometer, Handy PEA (Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK). The leaves of the papaya tree were kept in the dark for thirty minutes and then were hit by a flow of photons at an intensity of  $680 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The polyphasic curve of the chlorophyll *a* fluorescence for both cultivars of papaya during the time frame of the study demonstrates that there was not a significant difference among phases O, J, I and P. However, differences in the parameters of the energy flow by cross-section of the photosystem II were observed. The parameters of the energy flow showed that the Golden cultivar had higher rates of absorption (ABS/CS), capture of energy ( $\text{TR}_0/\text{CS}$ ) and transport of energy ( $\text{ET}_0/\text{CS}$ ). These results suggest that the Golden cultivar showed more efficiency than the Gran Golden cultivar when utilizing luminous energy in the period with the highest level of precipitation. However, this cultivar also showed a higher rate of dissipation of energy ( $\text{DI}_0/\text{CS}$ ) reflected in an increase of initial fluorescence ( $F_0$ ), considered an indication of stress in plants, and the lessening of the quantum efficiency of the photosystem II observed in this

period. The Gran Golden cultivar showed an increase in the capture ( $TR_o/CS$ ) and the transport of energy ( $ET_o/CS$ ). This increase may have contributed to this cultivar presenting greater quantum efficiency of the photosystem II in the period of lowest precipitation levels. In accordance with the results achieved by this study it can be observed that the variations of precipitation occurred in the area of cultivation of the papaya trees influenced the efficiency of utilization of the energy absorbed by the chlorophylls.



### 3.1 INTRODUÇÃO

A plasticidade do vegetal à radiação solar depende do ajuste de seu aparelho fotossintético, permitindo que a energia solar seja convertida eficientemente em carboidratos e conseqüentemente promovendo um maior crescimento (VILLELA e RAVETTA, 2000). Quando o fotossistema II (FSII) é danificado por algum tipo de estresse, as características da fluorescência são alteradas, motivo pelo qual a fluorescência da clorofila *a* tem sido utilizada como uma medida do estado fisiológico de tecidos verdes (DeELL e TOIVONEN, 2000).

A sensibilidade da fluorescência da clorofila *a* às perturbações no metabolismo e a facilidade e rapidez com que as medidas são realizadas, torna-a uma excelente ferramenta na identificação de perturbações metabólicas nas plantas (BARBAGALLO et al., 2003).

Os sinais básicos emitidos pela fluorescência são  $F_o$ ,  $F_M$ ,  $F_v$  e a razão entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima ( $F_v/F_M$ ) que fornece uma estimativa da eficiência quântica na fase fotoquímica da fotossíntese (KRAUSE e WEIS, 1991; COSTA et al., 2002; GOLÇALVES et al., 2005).

Para se complementar o estudo do funcionamento do FSII pode-se aplicar o teste OJIP demonstrado por Strasser e Strasser (1995) que determina quantitativamente o fluxo de energia por secção transversal do FSII. Force et al. (2003), demonstraram a vantagem de usar o teste OJIP para avaliar o funcionamento do FSII e não somente o parâmetro  $F_v/F_M$ .

A cultura do mamoeiro está inserida em regiões tropicais, onde se verifica alta intensidade luminosa, com temperatura elevada e variações na pluviosidade praticamente durante todo o ano. Esses fatores são considerados estressantes à cultura, de forma que o mamoeiro necessita de mecanismos fisiológicos de resposta a estas adversidades ambientais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética da emissão da fluorescência da clorofila *a* em duas cultivares de mamoeiro levando-se em consideração as condições de pluviosidade e temperatura da região de cultivo.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Material vegetal e condição de cultivo**

O material vegetal utilizado neste estudo foram plantas de mamoeiro (*Carica papaya* L.), cultivares Golden e Gran Golden, em período reprodutivo há aproximadamente 6 meses, localizadas em um plantio comercial na Cidade de Jacupemba, Município de Aracruz, região norte do Estado do Espírito Santo, a 105 Km de Vitória, Latitude 19° 24"(S) e Longitude 40° 04"(W).

Os valores médios mensais da temperatura e pluviosidade (Figura 8) ocorridas na região, durante o período de estudo, foram obtidos da estação meteorológica do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) situada no Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), Latitude 19° 41" (S) e Longitude 40° 07" (W).

A região norte do Estado do Espírito Santo caracteriza-se por possuir uma estação seca (inverno) e uma estação chuvosa (verão). A coleta dos dados ocorreu no período de inverno na região. Foram utilizados para a discussão deste trabalho os resultados obtidos nos meses de junho e agosto de 2005. A pluviosidade do mês de junho foi considerada atípica para a região, quando a precipitação ocorrida foi acima da esperada. O mês de agosto foi o mês subsequente à redução de aproximadamente 60% na disponibilidade de água.

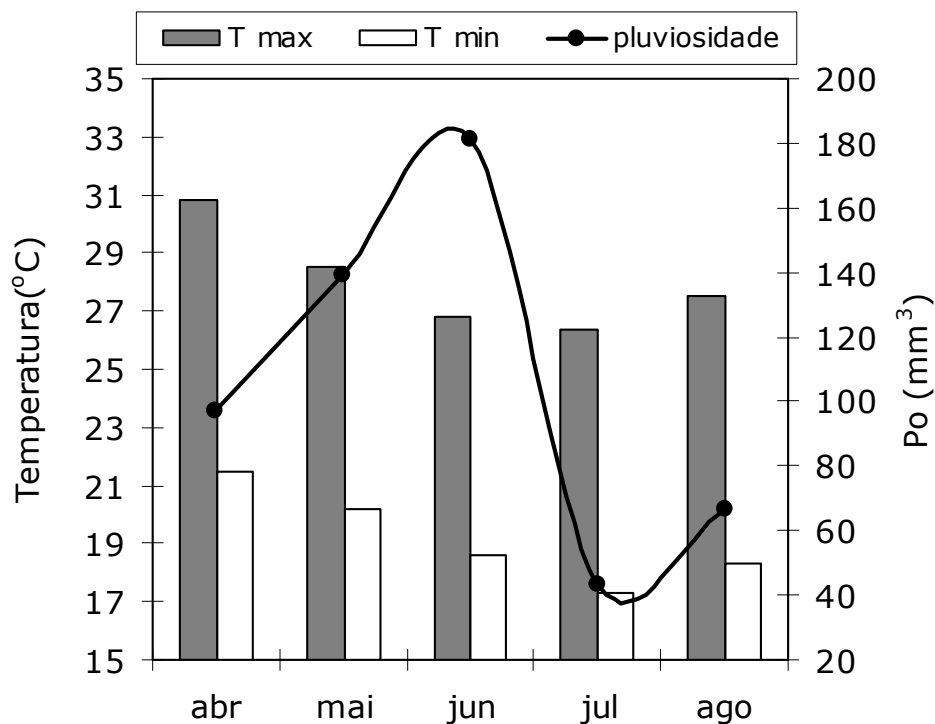


Figura 8 – Precipitação ocorrida ( $P_o$ ) e temperatura máxima (T max) e mínima (T mín) na região de Jacupemba, ES, no período de abril a agosto de 2005.

### 3.2.2 Avaliação do teor de clorofila total

O teor de clorofilas das folhas do mamoeiro, cv. Golden e Gran Golden, foi obtido com o medidor portátil de clorofilas, SPAD-502 (Minolta, Japan). Foram utilizadas 10 medidas em cada uma das 10 folhas amostradas, nas quais foram tomadas as medidas de fluorescência da clorofila *a*.

### 3.2.3 Avaliação da fluorescência da clorofila *a*

Trinta minutos após o período de escuro, as medidas de fluorescência da clorofila *a* foram tomadas no ramo central da folha completamente expandida, localizada abaixo da primeira inserção floral. A fluorescência transitória da clorofila *a* foi obtida com um fluorômetro portátil (Handy PEA, Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK) no período da manhã, entre as 8:00 e as 10:00 horas. A área foliar de 5 mm de diâmetro recebeu um flash de luz na intensidade de  $680 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As características utilizadas da fluorescência foram: fluorescência inicial ( $F_0$ ); fluorescência máxima ( $F_M$ ); fluorescência variável, ( $F_V = F_M - F_0$ ) e eficiência quântica do fotossistema II (razão  $F_V/F_M$ ).

### 3.2.4 O Teste OJIP

Os aspectos transitórios da fluorescência refletem a cinética e a heterogeneidade envolvidos na sensibilidade do *pool* de PQ aos elétrons e, portanto, foram usados como uma ferramenta para o estudo *in vivo* da eficiência fotoquímica do FSII.

O teste OJIP foi empregado para analisar o fluxo de energia pelo fotossistema II. O centro de reação do FSII é regulado pelos estágios denominados absorção da energia luminosa (ABS), captura da energia de excitação ( $TR_0$ ), conversão da energia de excitação para o transporte do elétron ( $ET_0$ ) e dissipação de energia ( $DI_0$ ). Neste trabalho observou-se o fluxo de energia por secção transversal pré-excitada (CS) por meio das razões: ABS/CS (absorção),  $TR_0/CS$  (captura),  $ET_0/CS$  (transporte de elétrons) e  $DI_0/CS$  (dissipação de energia).

Os parâmetros acima listados são inter-relacionados e definem as etapas do teste OJIP, sugeridos por Strasser et al. (1995), onde O é definido como a eficiência da fluorescência inicial; O à J a redução de  $Q_A$  em  $Q_A^-$

(fase fotoquímica dependente da intensidade luminosa) e, J à I e P, redução do *pool* de plastoquinona (fase não-fotoquímica).

### **3.2.5 Análise estatística**

Foram utilizadas 10 plantas de cada cultivar escolhidas aleatoriamente na área de produção comercial para a obtenção dos dados de teores de clorofila e de fluorescência da clorofila. O delineamento estatístico empregado foi inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância e quando os valores de F foram significativos, as comparações entre as médias foram realizadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de acordo com Pimentel-Gomes (1990).

## **3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Ao se avaliar os teores de clorofila total no mamoeiro durante o período de inverno na região de cultivo (Figura 9), observa-se que houve diferença significativa entre as cultivares no mês de maior pluviosidade (junho). A cultivar Golden apresentou maior teor de clorofilas (37,6) do que a cultivar Gran Golden (34,0).

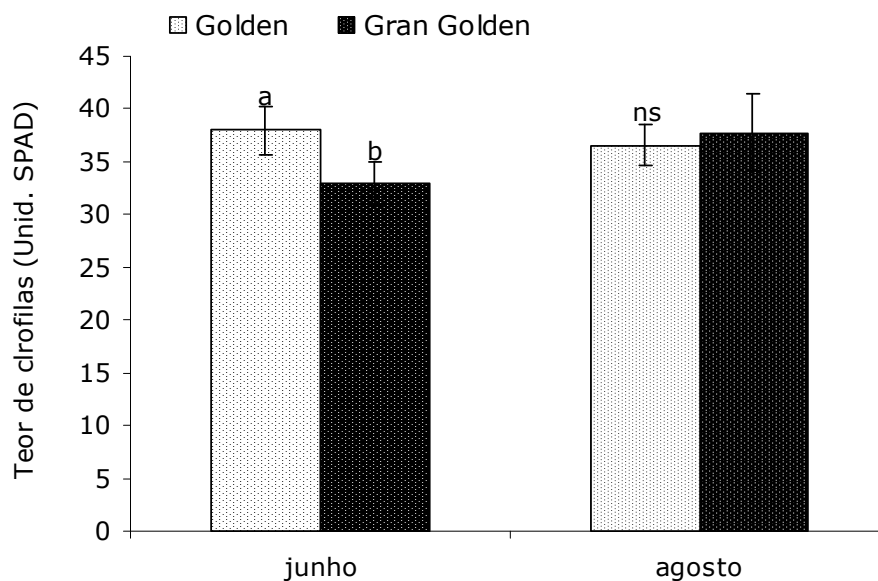


Figura 9 – Teores de clorofila obtidos em folhas de mamoeiro (*Carica papaya* L.), cultivares Golden e Gran Golden, nos meses de maior (junho) e menor (agosto) precipitação. Colunas seguidas por letras diferentes em cada mês, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n=10). ns, indica diferença não significativa entre as médias.

As clorofilas possuem como principal função a captação da energia luminosa. Uma parte considerável da radiação absorvida pelos pigmentos fotossintéticos é re-emitida como fluorescência o que significa dizer que o conteúdo de clorofilas do vegetal pode interferir na eficiência quântica do fotossistema II, expressa pela razão  $F_V/F_M$  (BEHERA e CHOUDHURY, 2002).

Os resultados da razão  $F_V/F_M$ , no mamoeiro cv. Golden e Gran Golden, durante o período analisado, são mostrados na Figura 10. Embora não tenha havido diferenças significativas para as razões  $F_V/F_M$  em relação aos períodos estudados (dados não mostrados), em média a cultivar Gran Golden apresentou valor de  $F_V/F_M$  superior à cultivar Golden.

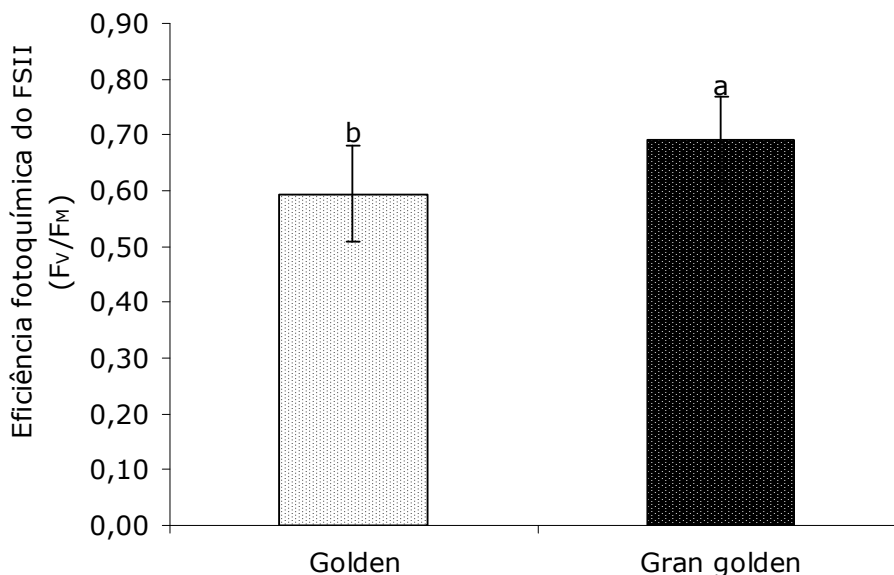


Figura 10 – Eficiência fotoquímica do fotossistema II (razão  $F_V/F_M$ ) em folhas de mamoeiro (*Carica papaya* L.) das cultivares Golden e Gran Golden nos períodos estudados na região de cultivo. Colunas seguidas por letras diferentes, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n= 10).

Observa-se que a cultivar Gran Golden apresentou a eficiência fotoquímica do FSII ( $F_V/F_M=0,70$ ) estatisticamente superior àquela encontrada na cultivar Golden ( $F_V/F_M=0,59$ ). Quando comparados com os valores relatados por Bøllhar-Nordenkampf et al. (1993), que sugerem valores da razão  $F_V/F_M$  entre 0,75 e 0,85 para demonstrar uma eficiente conversão da energia luminosa no FSII, observa-se que os resultados encontrados estão bem abaixo do esperado.

Resultados semelhantes, com baixa eficiência quântica do FSII em mamoeiro, também foram encontrados por outros pesquisadores. Campostrini et al. (2003) e Gomes et al. (2003), observaram que plantas de mamoeiro das cultivares Tainung e Sunrise Solo, cultivadas no Espírito Santo não apresentaram valores de  $F_V/F_M$  acima de 0,75. Fontes (2005),

também observou que as cultivares Tainung e Sunrise Solo apresentam baixos valores de  $F_V/F_M$  (aproximadamente 0,60) no período de inverno na região norte do Estado do Espírito Santo. Esse autor demonstrou o efeito da baixa disponibilidade hídrica no rendimento quântico do FSII, independente do teor de clorofilas nas folhas.

As cultivares Tainung e Sunrise Solo apresentam folhas mais esverdeadas do que as cultivares Golden e Gran Golden, porém sua eficiência quântica não ultrapassou 0,75 nos diversos trabalhos realizados até aqui. Vários autores relatam que esse resultado pode variar de acordo com a idade da folha em que é feita a medida da fluorescência da clorofila *a*, de forma que folhas no estágio de senescência apresentam baixo conteúdo de clorofilas e baixo rendimento quântico do FSII (CAMPOSTRINI et al., 2003; GOMES et al., 2003; FONTES, 2005).

Castro et al. (2005), ao relacionar os teores de clorofilas nas folhas das cultivares Golden e Sunrise Solo, com a eficiência quântica do fotossistema II ( $F_V/F_M$ ), observaram que na cultivar Golden os valores da razão  $F_V/F_M$  permaneceram elevados (entre 0,75 e 0,85) quando os valores de clorofilas totais era de 35,71. No presente trabalho observa-se que o teor de clorofilas encontrado para as cultivares Golden e Gran Golden foi semelhante ao relatado por esses autores, porém os valores de eficiência quântica do fotossistema II foram menores, aproximadamente 0,64.

Segundo Srivastava et al. (1999), a baixa razão  $F_V/F_M$  indica que a energia luminosa não foi suficientemente convertida nos centros de reação do fotossistema II. Entretanto, desde sua descoberta em 1931, a cinética da fluorescência da clorofila *a* vem sendo usada e outras propriedades são continuamente detectadas. Novas instrumentações tornam possível seguir as rápidas mudanças no caminho de transferência dos elétrons desde o centro de evolução do  $O_2$  até  $Q_A$ , então até  $Q_B$  e, por último, até o "pool" de plastoquinonas. Segundo Strasser et al. (2000), essas transferências



de elétrons são muito sensíveis a diferentes fatores do ambiente causadores de estresse. Considerando-se que o metabolismo é altamente dependente das transferências da energia, a fluorescência da clorofila *a* do FSII pode ser considerada como uma poderosa ferramenta para a detecção de estresse na planta.

Os parâmetros avaliados neste trabalho foram em nível de secção transversal (CS) do FS II. Estes parâmetros compreendem a absorção de fótons (ABS/CS), a captura de elétrons ( $TR_o/CS$ ), o transporte de elétrons (ET/CS) e a dissipação da energia de excitação ( $DI_o/CS$ ) além da razão RC/CS que indica a quantidade de centros de reação por secção transversal do FSII (STRASSER e STRASSER, 1995).

Na Figura 11 observa-se que as maiores taxas de captura de elétrons ( $TR_o/CS$ ) e de número de centros de reação (RC/CS) foram observados na cultivar Golden enquanto que em Gran Golden esse número foi estatisticamente menor.

Segundo Strasser et al. (2000), a razão RC/CS mostra a quantidade de centros de reação ativos e conseqüentemente haverá maiores taxas de captura de energia. A inativação de centros de reação do FSII compromete sua estrutura e conseqüentemente sua função causando alterações na eficiência fotoquímica do FSII ( $F_V/F_M$ ). Os resultados obtidos aqui (Figura 10 e 11) discordam dessa relação. A cultivar Gran Golden não diminuiu a eficiência fotoquímica com a diminuição do número de centros de reação. Possivelmente a quantidade de centros de reação ativos foi elevada em relação aos inativos.

De acordo com Baker (1991), a fotoinibição acontece, provavelmente, quando ocorrem danos no centro de reação. O estresse pode causar um dano funcional no transporte de elétrons e um dano estrutural por danificar a proteína D1 do centro de reação (TAKAHASHI et al., 2002).

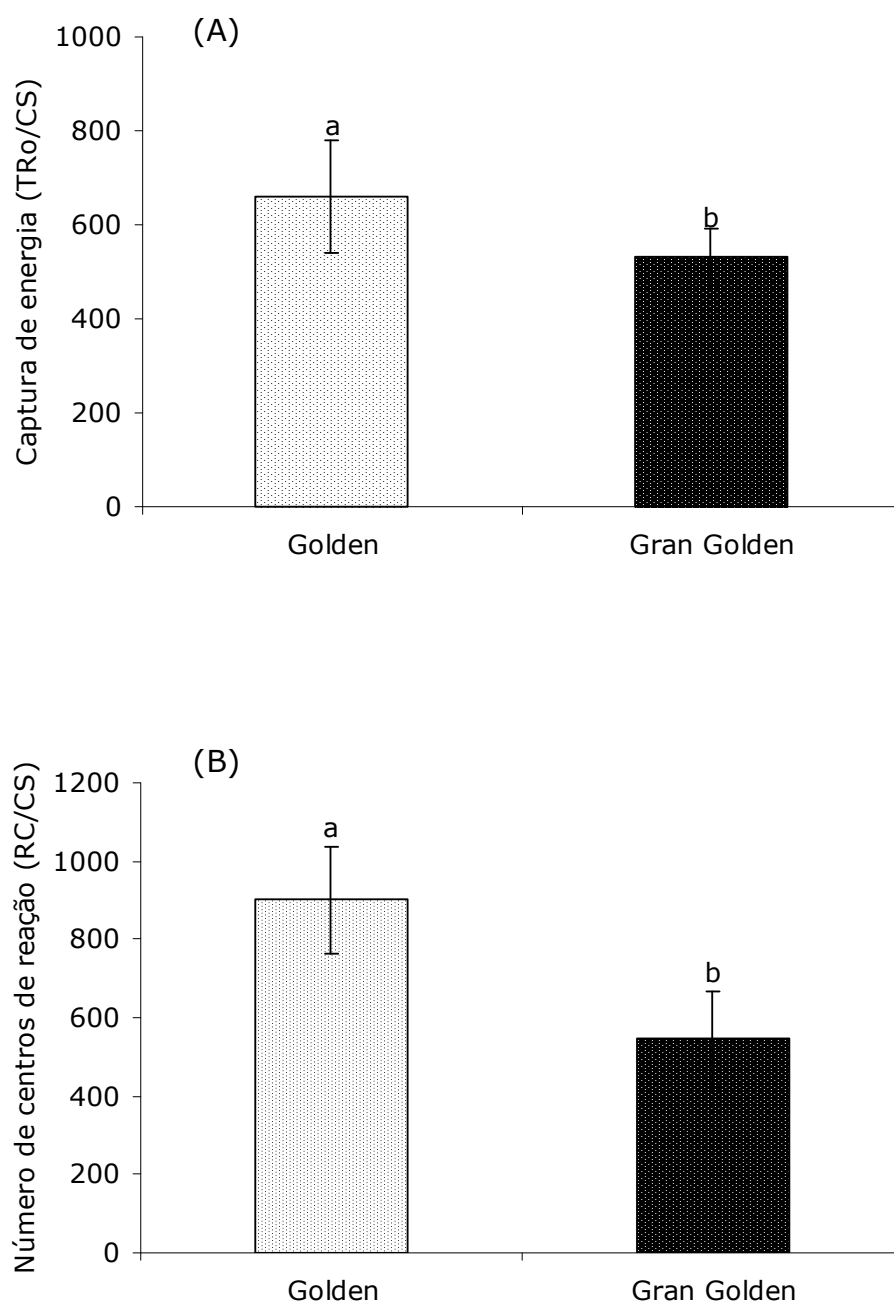


Figura 11 – Captura de energia de excitação (A) e número de centros de reação por secção transversal do FSII (B) em mamoeiro, cultivares Golden e Gran Golden. Colunas seguidas por letras diferentes, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n= 10).

A Figura 12 mostra a dissipação de energia absorvida pelo fotossistema II em ambas as cultivares. A cultivar Gran Golden apresentou uma maior dissipação da energia absorvida ( $DI_o/CS$ ) possivelmente em decorrência da menor taxa de captura de energia ( $TR_o/CS$ ) demonstrada na Figura 11.

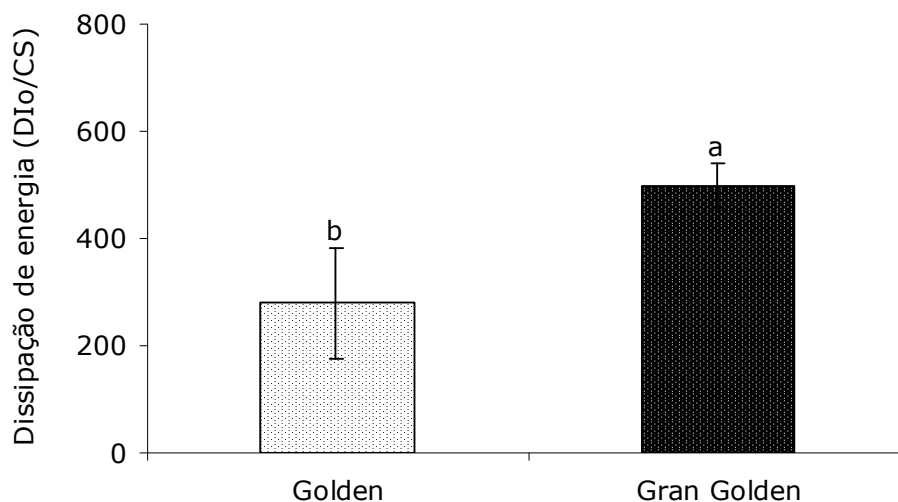


Figura 12 – Dissipação da energia absorvida por secção transversal do FSII ( $DI_o/CS$ ) em mamoeiro, cultivares Golden e Gran Golden. Colunas seguidas por letras diferentes, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $n= 10$ ).

Este fato foi também observado por Force et al. (2003). Ao trabalharem com duas espécies de plantas ornamentais, os autores observaram que  $TR_o/CS$  em *Monstera* foi inferior ao encontrado em *Philodendron* e sugerem que esse fator poderia interferir na dissipação da energia absorvida. Anteriormente, Appenroth et al. (2001), já haviam relatado que o decréscimo no transporte de elétrons ( $TR_o/CS$ ) é um indicador de estresse na alga *Spirodela*.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a cv. Golden utiliza mais eficientemente a energia absorvida (Figura 11 e 12). A diminuição na captura de elétrons e o aumento na dissipação de energia pela cv. Gran

Golden pode ser um mecanismo de regulação da atividade fotossintética em resposta ao estresse.

A cultura do mamoeiro no Norte do Estado do Espírito Santo está submetida a alta intensidade luminosa, com temperatura elevada e variações na pluviosidade praticamente durante todo o ano. Diversos pesquisadores têm estudado as respostas do mamoeiro às variações edafoclimáticas a que estão submetidas as diferentes cultivares nesta região (ALMEIDA, et al., 2003; FONTES, 2005).

Durante o mês de junho ocorreu a maior precipitação do período de inverno seguida de um declínio de aproximadamente 63% no mês de julho. A temperatura teve uma queda constante até o mês de julho, porém, a amplitude entre a temperatura máxima e a mínima não apresentou grandes variações (Figura 8).

Uma vez que a disponibilidade de água é apontada como um fator de estresse na cultura, a análise do fluxo de energia durante a emissão da fluorescência da clorofila *a* poderia dar subsídios para o estudo do comportamento fisiológico da cultura do mamoeiro.

Avaliando-se a absorção e o transporte de elétrons em ambas as cultivares ao longo do período estudado (Figura 13), pode-se observar que a cultivar Golden apresentou uma elevada taxa de absorção de energia no período de maior precipitação, seguida de um aumento na taxa de transporte de elétrons. A cv. Gran Golden não apresentou diferença significativa nos valores de ABS/CS, mas apresentou um aumento em ETo/CS com a diminuição na precipitação.

Na Figura 14 observa-se que a cv. Gran Golden apresentou um aumento no número de centros de reação e um aumento na taxa de captura de energia, enquanto que, para a cv. Golden mesmo não havendo diferença significativa no número de centros de reação, houve uma maior taxa de captura de energia durante o período de alta precipitação.

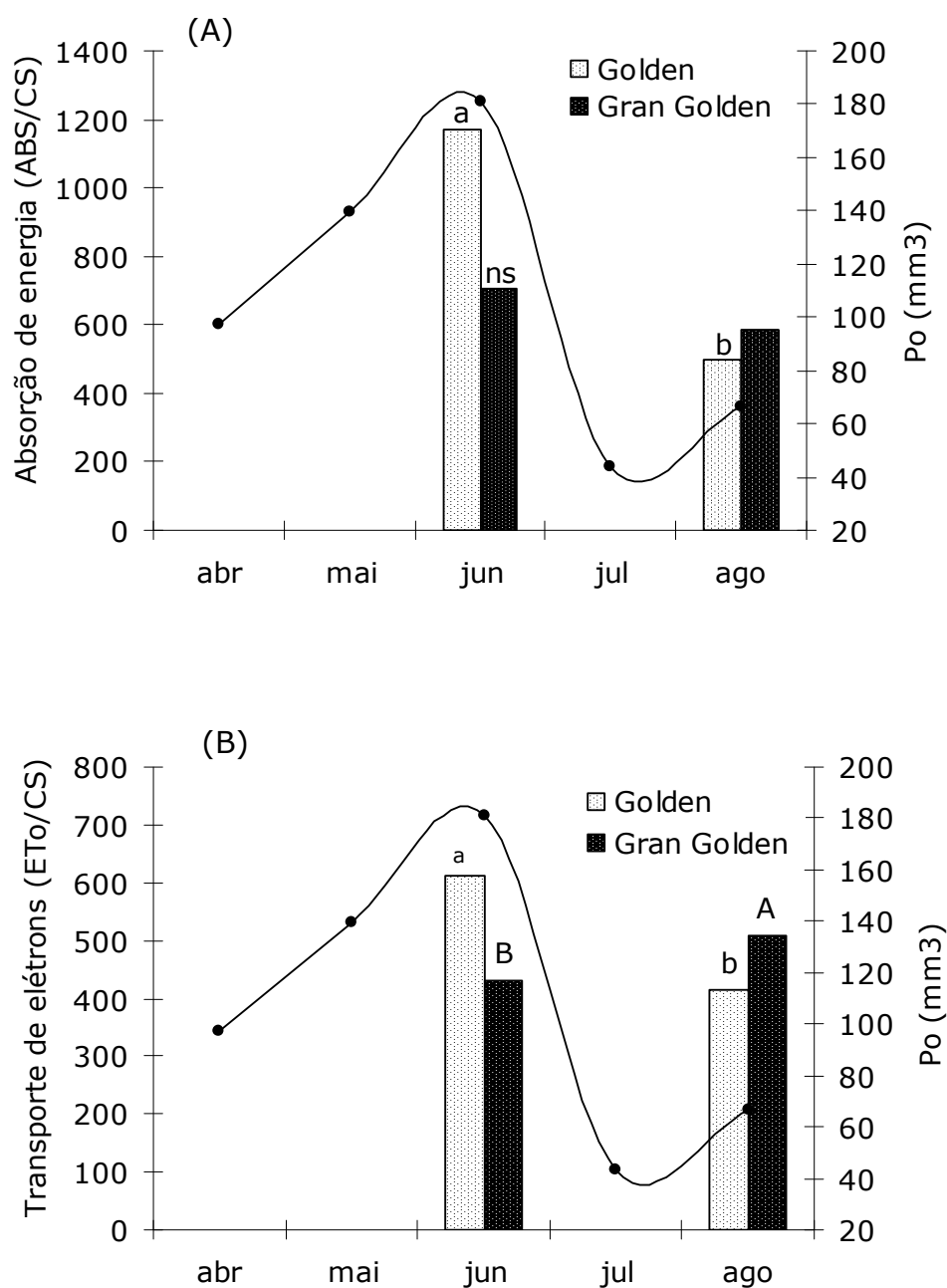


Figura 13 – Absorção de energia (A) e transporte de elétrons (B) por secção transversal do FSII em mamoeiro, cultivares Golden e Gran Golden nos períodos estudados na região de cultivo. Letras diferentes indicam diferença significativa para a cultivar entre os meses de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $n= 10$ ). ns, indica diferença não significativa entre as médias.

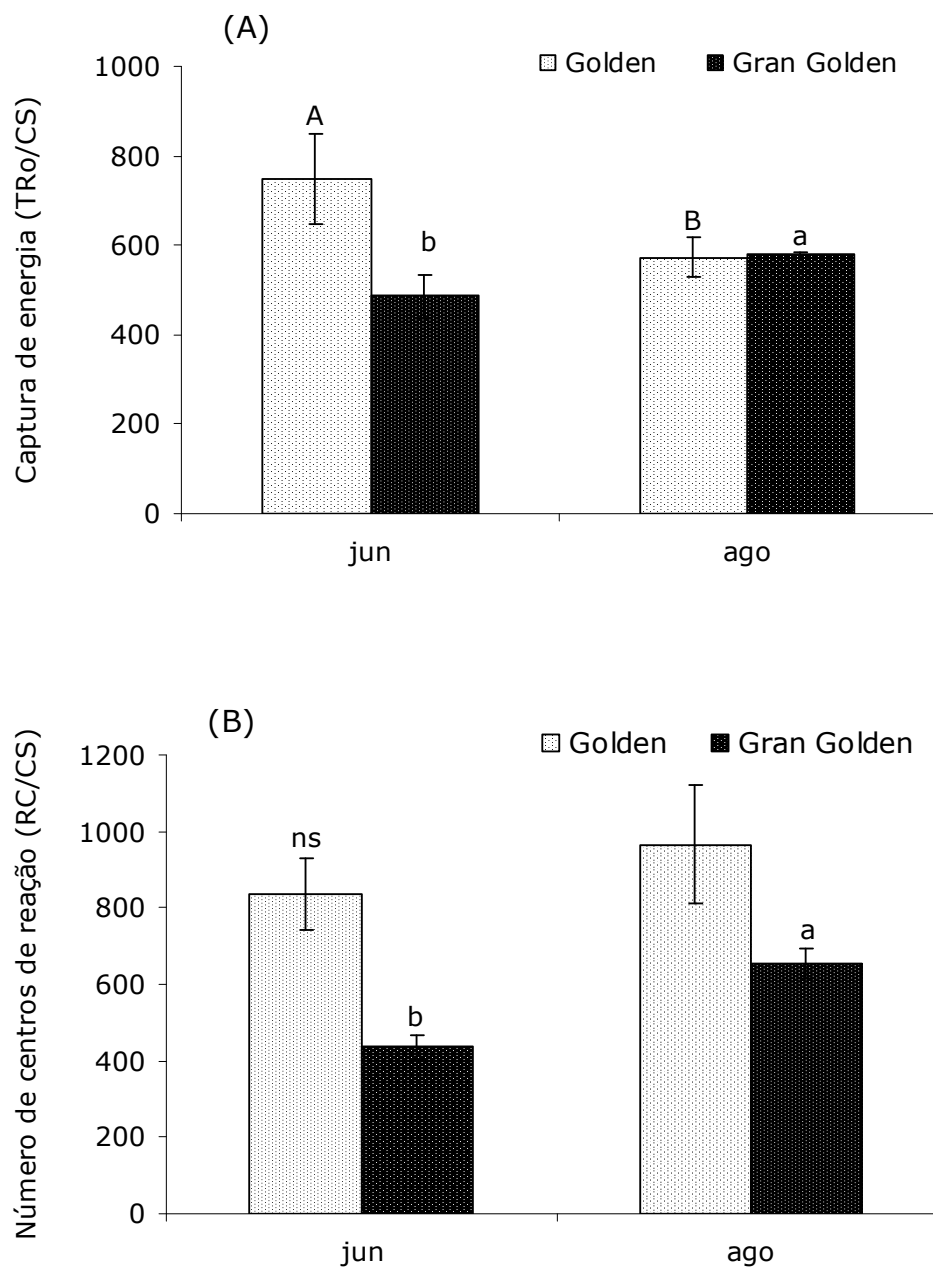


Figura 14 – Captura de energia (A) e número de centros de reação (B) por secção transversal do FSII do mamoeiro, cultivares Golden e Gran Golden. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os meses estudados no período de inverno, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade (n=10). ns, indica diferença não significativa entre as médias.

O fato da cultivar Gran Golden ter mostrado uma recuperação tanto no número de centros de reação quanto na taxa de captura de energia no mês de agosto (menor precipitação), indica tolerância à baixa disponibilidade de água.

Não se observou diferença significativa na dissipação de energia luminosa (Figura 15) para a cv. Gran Golden enquanto que na cv. Golden houve uma queda significativa na quantidade de energia dissipada no período de menor índice de precipitação.

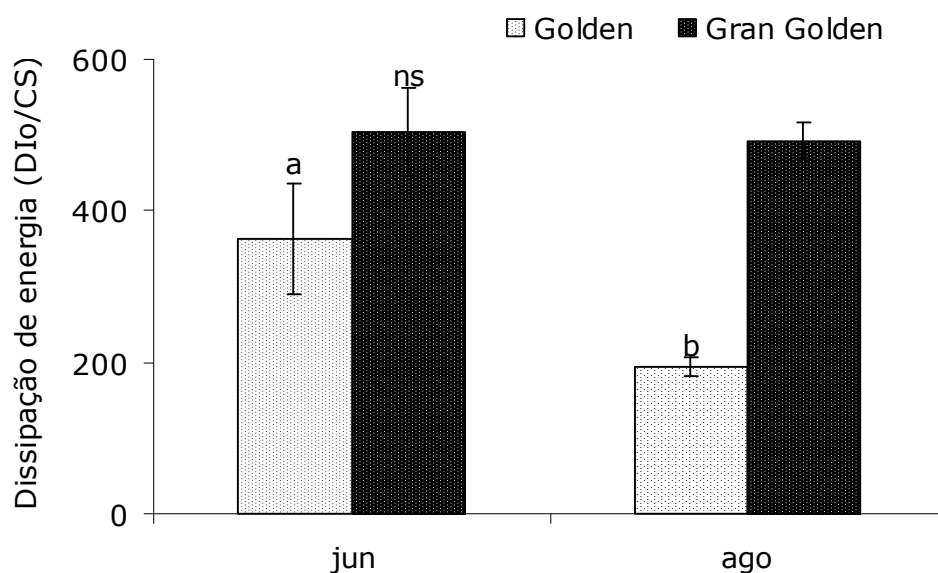


Figura 15 – Dissipação de energia por secção transversal do FSII do mamoeiro, cultivares Golden e Gran Golden. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os meses do período de inverno de acordo com o teste de Tukey em 5% de probabilidade. (n=10)

De acordo com os resultados mostrados, pode-se sugerir que no período de maior precipitação (mês de junho), a cultivar Golden foi mais eficiente na utilização da energia luminosa. Fato evidenciado pelos valores superiores de absorção da energia (ABS/CS), taxa de transporte de energia (ET<sub>o</sub>/CS) e captura da energia pelos centros de reação (TR<sub>o</sub>/CS).

A cultivar Gran Golden respondeu melhor à menor disponibilidade de água (mês de agosto) não reduzindo os valores de transporte de elétrons (ET<sub>o</sub>/CS) e captura de energia (TR<sub>o</sub>/CS), tendo aumentado o número de centros de reação, apresentando uma maior eficiência quântica no período seco.

A figura 16 evidencia a variação inicial da fluorescência em ambas as cultivares no período avaliado. Observa-se que a cv. Golden apresentou a fluorescência inicial muito alta no mês de junho. O aumento em F<sub>o</sub> pode indicar que as plantas estavam sob estresse (XU et al., 1993). É amplamente aceito que o aumento na fluorescência da clorofila *a* ocorre a partir do nível inicial, F<sub>o</sub> até o nível máximo, F<sub>M</sub> ou F<sub>P</sub> (NERBAUER e SCHREIBER, 1987; STRASSER et al., 1995; FORCE et al., 2003; BUKHOV et al., 2004).



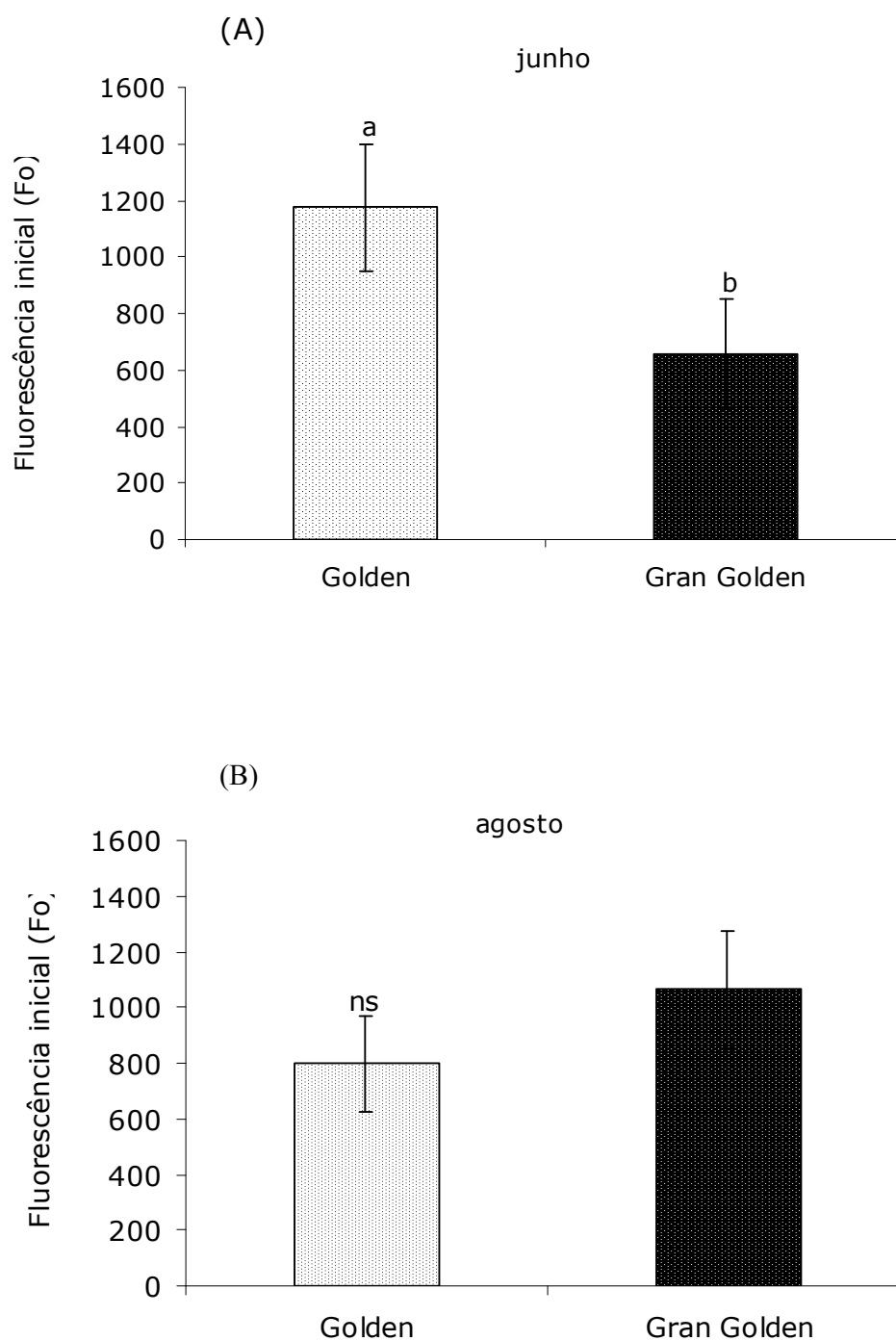


Figura 16 - Fluorescência inicial ( $F_o$ ) obtida nas cultivares Golden (G) e Gran Golden (GG) no período de inverno. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares de acordo com o teste de Tukey em 5% de probabilidade ( $n=10$ ). \*, indica diferença não significativa entre as médias.

As variações observadas no momento em que todo o centro de reação se encontrava "aberto" é refletido no formato das curvas da fluorescência polifásica. Esta curva pode ser modificada de acordo com a intensidade luminosa (SRIVASTAVA e STRASSER, 1996; KRÜGER et al., 1997), temperatura ou déficit hídrico (SRIVASTAVA et al., 1997; STRASSER, 1997). Por exemplo, Strauss et al. (2005), avaliaram a tolerância ao frio em diferentes genótipos de soja e observaram que o frio diminuiu a eficiência de transporte de elétrons no FSII e que as etapas da curva OJIP são sensíveis às diferentes respostas ao frio.

Com as equações  $ABS/CS$ ,  $TR_o/CS$ ,  $ET_o/CS$ ,  $DI_o/CS$  e  $RC/CS$ , que representam as modificações no fluxo de energia no FSII (Figuras 11-15) pode-se plotar a cinética da fluorescência rápida numa escala logarítmica e observar a curva OJIP e suas etapas. A Figura 17 mostra a curva polifásica da fluorescência da clorofila *a* para ambas as cultivares de mamão no período estudado. Observa-se que não houve diferença significativa entre as fases O, J, I e P. No entanto, como discutido anteriormente, foram observadas diferenças nos parâmetros de fluxo de energia por secção transversal do FSII.

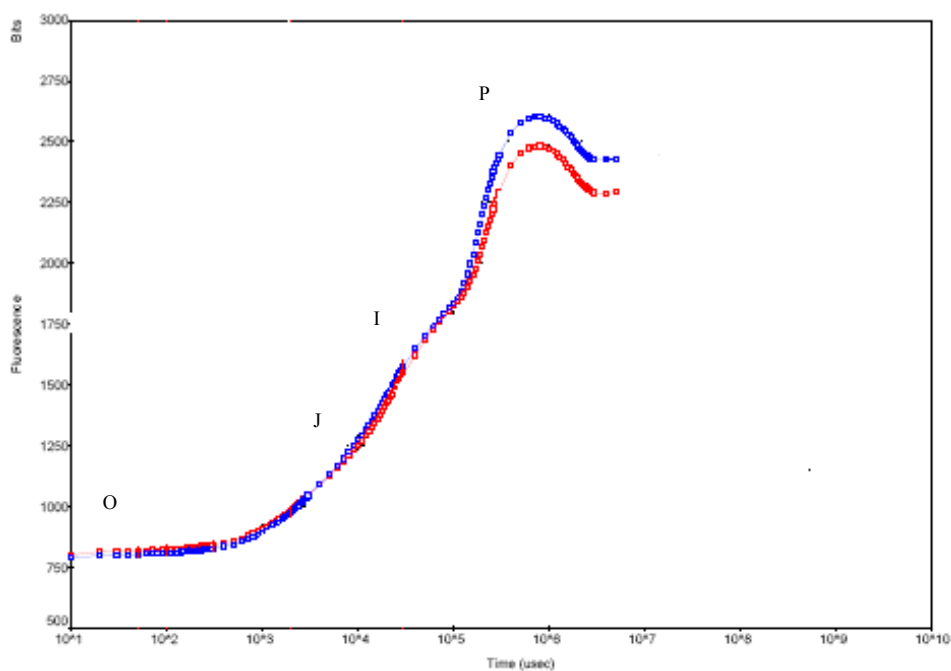


Figura 17 – Curva da fluorescência da clorofila *a* em folhas de mamoeiro, cultivares Golden (■) e Gran Golden (■) exibindo as fases O-J-I-P. (n=10)

Os resultados obtidos neste trabalho permitem sugerir que a cv. Golden mostrou-se mais eficiente na utilização da energia luminosa no período em que houve maior precipitação do que a cv. Gran Golden. O teste OJIP sugere a possível tolerância da cv. Gran Golden durante o período de menor precipitação, uma vez que essa cultivar apresentou um aumento na captura ( $TR_0/CS$ ) e transporte de energia ( $ET_0/CS$ ) relatados nas Figuras 14 e 13. Este aumento fez com que a cv. Gran Golden apresentasse maior eficiência quântica do FSII (Figura 10).

Com isso pode-se observar que as variações de precipitação são um fator de estresse para o mamoeiro uma vez que interferiram na cinética da emissão da fluorescência da clorofila, além do que, o comportamento da eficiência fotoquímica do FSII para cada cultivar é variável para uma mesma quantidade de chuva. Sendo assim, faz-se importante outros

estudos sobre o diferente comportamento fotoquímico entre as cultivares em relação à produtividade de frutos.

## 4. CAPÍTULO 2

### **ATIVIDADE DA CELULASE E DA $\beta$ -GALACTOSIDASE E SUA RELAÇÃO COM A PERDA DE ÁGUA E FIRMEZA DOS FRUTOS DE MAMÃO, CULTIVARES GOLDEN E GRAN GOLDEN**

#### RESUMO

O consumo do mamão como fruta fresca está condicionado à melhoria na qualidade dos frutos e a firmeza da polpa é um dos aspectos indicadores de qualidade que influencia na sua comercialização. Dessa forma, a compreensão dos processos fisiológicos do amadurecimento fornece subsídios para solução de problemas que afetam a produção e conservação dos frutos contribuindo para o aumento da produtividade e melhoria da sua qualidade. O amolecimento tem sido postulado como consequência da atividade de enzimas hidrolíticas na estrutura da parede celular do fruto que reflete na perda de firmeza. O objetivo deste trabalho foi estudar o amadurecimento pós-colheita de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.), cultivares Golden e Gran Golden, cultivados no Norte do Estado do Espírito Santo, enfatizando a ação das enzimas celulase e  $\beta$ -galactosidase no amolecimento da polpa. Durante 8 dias após a colheita foram feitas análises de perda de água, firmeza da polpa e da atividade das enzimas celulase e  $\beta$ -galactosidase. A porcentagem de perda de água dos frutos foi calculada de acordo com a perda de massa e a perda de firmeza foi obtida com o auxílio do aparelho penetrômetro. A atividade das enzimas celulase e  $\beta$ -galactosidase foram previamente padronizadas para o mamoeiro e então mensuradas para obtenção das correlações com a perda de água e as mudanças de firmeza da polpa. Os resultados mostraram que a maior perda da firmeza nos frutos das cultivares Golden e Gran Golden ocorreu do 3º para o 4º dia após a colheita e que os frutos da cv. Gran Golden perdem a firmeza da polpa mais rapidamente do que os frutos da cv. Golden. Este resultado confirma uma observação relatada

pelos agricultores de mamão, de que os frutos da cv. Gran Golden têm um menor período pós-colheita. Observou-se um aumento na atividade das enzimas celulase e  $\beta$ -galactosidase durante o amadurecimento dos frutos de ambas as cultivares, principalmente na cv. Gran Golden, cuja firmeza da polpa foi menor. Esses resultados evidenciam a participação da celulase e  $\beta$ -galactosidase no processo de amolecimento da polpa do mamão, e mostram que o estudo das enzimas de degradação de parede celular podem esclarecer dúvidas fundamentais da fisiologia do amadurecimento do mamão.

## CHAPTER 2

**CELLULASE AND  $\beta$ -GALACTOSIDASE ACTIVITY RELATING WITH LOSS OF WATER AND PAPAYA FRUIT FIRMNESS, CULTIVARS GOLDEN AND GRAN GOLDEN**

## ABSTRACT

The consumption of papaya as fresh fruit depends on the improvement of the quality of the fruit and the firmness of the pulp is one of the indicating aspects of quality that influence this commerce. So, the understanding of the physiological process of ripening provides subsidies to solve problems that concern production and export, allowing the growth in productivity and the improvement of the quality of the fruit. The softening of the pulp tem has been assumed to be a consequence of the activity of hydrolytic enzymes in the structure of the cell wall of the fruit which results in loss of firmness. The goal of this research was the study of post harvest ripening of the fruit of the papaya tree (*Carica papaya* L.), Golden and Gran Golden cultivars, grown in northern Espírito Santo, highlighting the action of the enzymes cellulase and  $\beta$ -galactosidase in the softening of the pulp. In the 8 days following harvest firmness of pulp and loss of water were analyzed. The percentage of water loss of the fruit was calculated according to loss of mass and the percentage of loss of firmness was obtained with the aid of a penetrometer. The activities of the enzymes cellulase and  $\beta$ -galactosidase were previously standardized for the papaya tree and then measured for the obtainment of the relation with the loss of water and the changes in the firmness of the pulp. The results showed that the greatest loss in firmness in the fruit of the Golden and Gran Golden cultivars occurred between the 3<sup>rd</sup> and the 4<sup>th</sup> days after the harvest and that the fruit of the Gran Golden cultivar lose pulp firmness faster than those of the Golden cultivar. This result confirms a visual observation reported by

papaya growers, and that is that the fruit of the Gran Golden cultivar have a shorter post harvest period. An increase in the activities of the enzymes cellulase and  $\beta$ -galactosidase was observed during the ripening of the fruit of both cultivars, especially in the Gran Golden cultivar, whose pulp firmness lasted the least. These results are evidence of the role the enzymes cellulase and  $\beta$ -galactosidase play in the softening process of the pulp of the papaya, and show that the study of the enzymes that trigger the degradation of the wall of the cell can answer fundamental questions regarding the physiology of the ripening of the papaya.



## 4.1 INTRODUÇÃO

A alta perecibilidade do mamão é o principal problema da comercialização da fruta *in natura*, tanto no mercado nacional, como internacional. A falta do emprego de tecnologias de conservação limita o período de comercialização e diminui a qualidade dos frutos, tendo como conseqüência, redução do número de mercados consumidores. O consumo do mamão como fruta fresca está condicionado à melhoria na qualidade dos frutos. Desta forma, a aplicação de tecnologias de conservação pós-colheita é prioridade nesta cultura e de grande interesse para o agronegócio.

A compreensão dos processos fisiológicos de amadurecimento dos frutos fornece subsídios para solução de problemas que afetam a produção e comercialização e contribui para o aumento da produtividade e melhoria da sua qualidade, desenvolvendo produtos mais aceitáveis, aumentando a rentabilidade do agricultor e atendendo as exigências do mercado.

A firmeza do fruto do mamão pode indicar o seu estágio de maturação ou ponto de colheita e armazenabilidade, o que influencia na sua comercialização. Economicamente, a perda de firmeza é um evento pós-colheita muito importante devido aos cuidados necessários durante o manuseio, transporte e armazenamento dos frutos. Além desses fatores, a suscetibilidade às doenças aumenta proporcionalmente com o amolecimento do fruto (MANRIQUE e LAJOLO, 2004).

O amolecimento tem sido postulado como conseqüência da atividade de enzimas hidrolíticas nos polímeros de carboidrato (SEYMOUR e GROSS, 1996; MANRIQUE e LAJOLO, 2004) que causam um desarranjo nas estruturas da parede celular primária e lamela média do fruto (JACKMAN e

STANLEY, 1995). De acordo com Brett e Waldron (1996), a parede celular primária compreende duas fases: a fase constituída de microfibrilas de celulose e a matriz. Para que a parede celular primária seja completamente desestruturada, as microfibrilas de celulose e a matriz devem ser modificadas.

A celulose, que constitui as microfibrilas é uma cadeia de glicanos, unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4, formando um polímero linear. Essas microfibrilas de celulose são desestruturadas pela celulase, enzima capaz de romper as ligações glicosídicas, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose.

As pectinas da parede celular são despolimerizadas por enzimas pectinolíticas como a  $\beta$ -galactosidase (CARPITA e GIBEAUT, 1993; BALASUBRAMANIAM et al., 2005). Esta enzima age sobre os polímeros de galactose catalisando a clivagem de resíduos terminais de D-galactose em ligação  $\beta$ -1,4. Segundo Gross e Sams (1984), uma das grandes modificações na parede celular de frutos em amadurecimento é a perda de resíduos de galactose dos polímeros da parede.

A atividade da  $\beta$ -galactosidase, associada ao amadurecimento, têm sido previamente observada em alguns frutos como o tomate (CAREY et al., 1995), a maçã (ROSS, et al., 1994), o abacate (de VEAU et al., 1993) e o mamão (ALI et al., 1998). A importância dessa enzima no amadurecimento de mamão foi novamente indicada por Lazan et al., (2004).

A participação da celulase no amadurecimento de frutos já foi relatada em manga (ABU-SARRA e ABU-GOUKH, 1992). El-Zoghbi (1994) após avaliar a atividade desta enzima durante o amadurecimento de diversos frutos, concomitantemente com o declínio do conteúdo da celulose, sugeriu sua participação no amolecimento de frutos.

Em frutos de mamão, o mecanismo de ação dessas enzimas durante o processo de amadurecimento, ainda não está completamente esclarecido. Levando-se em consideração que o amadurecimento de frutos envolve a solubilização de carboidratos resultante da degradação da parede celular, e que frutos de mamão exibem alterações na firmeza da polpa que podem ser detectadas durante o amadurecimento, objetivou-se estudar o amadurecimento pós-colheita dos frutos do mamoeiro, cultivares Golden e Gran Golden, enfatizando a ação das enzimas celulase e  $\beta$ -galactosidase sobre o amolecimento da polpa.

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1 Coleta dos frutos e amostragem**

Os frutos de mamão das cultivares Golden e Gran Golden, de aproximadamente 350g, oriundos de plantas hermafroditas com aproximadamente 60 dias a partir do início de produtividade, foram coletados em um plantio comercial na Cidade de Jacupemba, Município de Aracruz, região norte do Estado do Espírito Santo, a 105 Km de Vitória, Latitude 19° 24"(S) e Longitude 40° 04"(W).

Para a coleta dos frutos, observou-se a coloração da casca, sendo coletados aqueles frutos que representavam o estágio 2 de amadurecimento. Segundo Sousa (1998), frutos neste estágio de amadurecimento são aqueles que apresentam casca verde claro e com duas estrias longitudinais a partir da base do fruto.

Os frutos foram colhidos manualmente e de forma aleatória sendo que, após a colheita, foram acondicionados em caixas plásticas, separados em camadas por plástico-bolha até serem analisados no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal na UFES.

Com a finalidade de remover as impurezas e os possíveis microorganismos, os lotes foram lavados em água e sabão e então semi-esterilizados em solução 5% de hipoclorito de sódio (v/v) e mantidos à temperatura ambiente de 25°C.

#### **4.2.2 Avaliação da perda de água**

Seis exemplares de cada cultivar foram previamente selecionados e pesados diariamente até o 8º dia após a colheita (dpc) em balança com sensibilidade de 0,5 g (Balmak, MP2, Brasil). A redução da matéria fresca do fruto foi representada pela diferença entre a massa diária em relação à pesagem no dia da colheita. Os resultados da avaliação da perda de massa foram expressos em porcentagem de perda de água por dia pós-colheita.

#### **4.2.3 Avaliação da firmeza da polpa**

A firmeza da polpa do mamão foi determinada com penetrômetro portátil (marca EFFEGI) de ponteiros com 8 e 13 mm de diâmetro, com leituras na faixa de 0,2 a 12,0 kgf e de 1,0 a 15,0 kgf. Os frutos foram cortados transversalmente na região mediana tomando-se 6 leituras por fruto ao redor da cavidade ovariana. Os resultados correspondentes foram expressos em kgf/cm<sup>2</sup> a partir da seguinte fórmula:

$P=F/A$ , onde:

P: firmeza da polpa (kgf/cm<sup>2</sup>)

F: força de penetração (kgf)

A: área da ponteira (cm<sup>2</sup>)

#### **4.2.4 Dosagem protéica e atividade enzimática**

##### **4.2.4.1 Extração de proteínas**

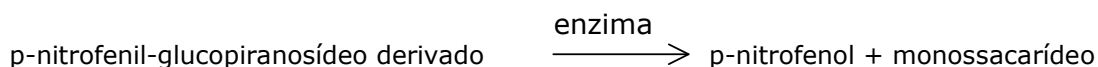
As proteínas foram extraídas segundo metodologia descrita por Karakurt e Huber (2003). A amostra de 20 g da polpa e 40 mL de etanol gelado (aproximadamente 4°C) foram homogeneizados durante 2 minutos em mixer (Britania Mix) para extração de carboidratos. Uma alíquota de 8 mL do homogenato foi centrifugado (Centrífuga Sigma, 3K30) a 16000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi homogeneizado com 5 mL de etanol 80% gelado e centrifugado novamente a 16000 g por 20 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuspensão em 2 mL de tampão acetato de sódio (25 mM pH 5,0 contendo NaCl 1,2 M), incubado por 30 minutos a 4°C e, posteriormente, centrifugado a 16000 g por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante obtido, denominado extrato protéico, foi utilizado para dosagens de proteínas e para avaliações das atividades enzimáticas (celulase e  $\beta$ -galactosidase).

##### **4.2.4.2 Dosagem de proteínas**

O conteúdo protéico do extrato foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando soro albumina bovina (BSA – Sigma) como padrão. Uma solução diluída de 500  $\mu$ L de água Milli-Q, contendo a amostra foi acrescida de 5 mL de reagente de cobre (solução de tartarato de sódio e potássio 2% (p/v), sulfato de cobre 2% (p/v), carbonato de sódio 3% (p/v) em NaOH 0,1 M, na relação 1:1:48. Após 10 minutos de repouso, foram adicionados 0,5 mL de reagente de Folin (1:2 de água) sendo a leitura realizada após 10 minutos, em absorbância a 660 nm.

#### 4.2.5 Método para os ensaios enzimáticos

A atividade da celulase foi determinada segundo método descrito por Schreier e Hartmann-Schreier (1987), e a atividade da  $\beta$ -galactosidase foi determinada segundo Karakurt e Huber (2003). Os métodos para a determinação de ambas as enzimas foram previamente padronizados para o mamão. O método de dosagem enzimática baseia-se na reação do p-nitrofenil derivado sendo hidrolisado pela enzima resultando nos produtos p-nitrofenol e monossacarídeo.



Para a enzima celulase, o substrato sintético utilizado foi o p-nitrofenil- $\beta$ -glicopiranosídeo (Sigma-Aldrich Company Ltd.) e para a enzima  $\beta$ -galactosidase foi o p-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosídeo (Sigma-Aldrich Company Ltd.). A atividade das enzimas foi determinada através da estimativa do p-nitrofenol liberado, que forma um cromógeno amarelo sob condições alcalinas, apresentando  $\lambda$  máximo a 400nm e o coeficiente de extinção molar de  $18,1 \times 10^3$ .

##### 4.2.5.1 Dosagem da atividade da celulase

Uma amostra de 1 mL da solução de p-nitrofenil- $\beta$ -glicopiranosídeo (4 mM em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0) foi pré-incubada em "banho-maria" (B. Braun Biotech International, Thermomix, Germany) a 37°C por 10 minutos. Em seguida adicionou-se 100  $\mu$ L do extrato protéico. O período de incubação para a reação enzimática foi de 20 minutos a 37°C. Ao final desse tempo, a reação foi paralisada pela adição de 2 mL de tampão  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaH}_2\text{CO}_3$  0,2 M e pH 9,8. A absorbância do p-nitrofenol foi

determinada a 400 nm. A atividade glicosidásica foi expressa em unidades enzimáticas, sendo 1 unidade definida como a quantidade de enzima que libera 1 nmol de p-nitrofenol por minuto nas condições da reação.

#### **4.2.5.2 Dosagem da atividade da $\beta$ -galactosidase**

Uma amostra de 350  $\mu$ L da solução de p-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosídeo (6,6 mM em tampão acetado de sódio 100 mM, pH 5,2) e 325  $\mu$ L de tampão acetado de sódio 25 mM pH 5,0 contendo NaCl 1,2 M foram pré-incubados a 37°C por 10 minutos. Em seguida adicionou-se 25  $\mu$ L do extrato protéico (obtido no item 4.2.4.1) e o período de incubação para reação enzimática foi de 20 minutos a 37°C. Ao final desse tempo, a reação foi paralisada pela adição de 1,75 mL de NH<sub>4</sub>OH 1 M contendo EDTA 2 mM e a absorbância do p-nitrofenol foi determinada a 400 nm. A atividade galactosidásica foi expressa em unidades enzimáticas, sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que libera 1 nmol de p-nitrofenol por minuto nas condições da reação.

#### **4.2.6 Análise estatística**

O delineamento estatístico empregado na análise de perda de água e firmeza da polpa foi inteiramente casualizado. Foram utilizados seis frutos para a determinação da perda de água e os frutos destinados às medidas de firmeza foram os mesmos utilizados para a extração protéica. Para a análise protéica e atividade enzimática foram utilizados três frutos sendo três amostras por fruto. Os dados foram submetidos à análise de variância e quando os valores de F foram significativos, as comparações entre as médias foram realizadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (PIMENTEL-GOMES, 1990). Também foram realizadas análises de

correlação entre as variáveis físicoquímicas e destas com a atividade das enzimas estudadas de acordo com Ribeiro-Júnior (2004).

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Perda de água

A maioria dos frutos possui entre 85 e 90% de água em relação à sua massa e a umidade relativa dos espaços intercelulares é próxima de 100%. Com isso a tendência do vapor de água é escapar desses espaços pela transpiração (HARDENBURG et al., 1986; MARENCO e LOPES, 2005).

O resultado da perda de água dos frutos das cultivares Golden e Gran Golden é mostrado na Figura 18.

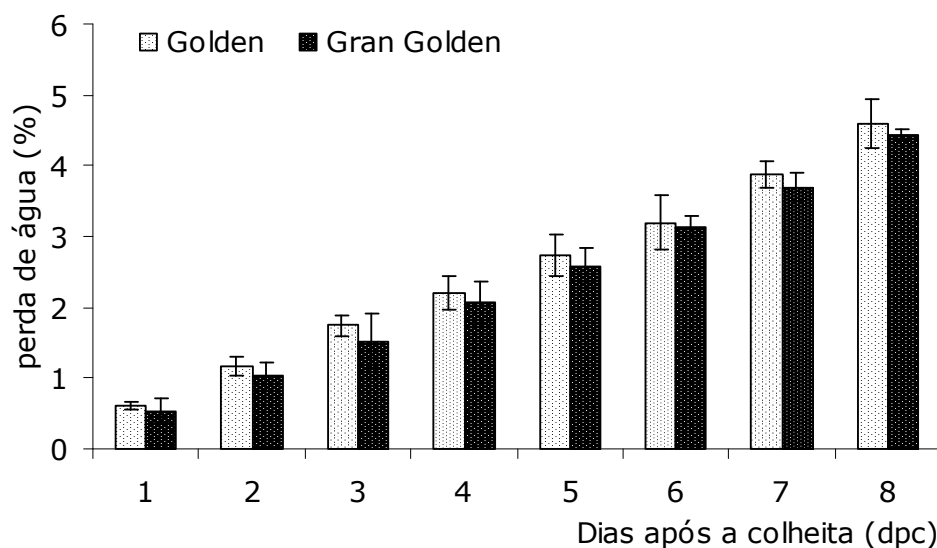


Figura 18- Porcentagem de perda de água acumulada durante 8 dias pós-colheita em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) das cultivares Golden e Gran Golden armazenadas em temperatura ambiente a 25°C. (n=18)



Os frutos apresentaram, em média, perda total de massa de aproximadamente 5,0 e 4,6% nas cultivares Golden e Gran Golden, respectivamente. Não houve diferença significativa entre as cultivares durante os 8 dias após a colheita (dpc). Após os 8 dias da colheita, os frutos estavam completamente amarelados e apresentavam aspecto de murchamento e enrugamento da casca.

Esse resultado diverge do encontrado por Ferraz (2005), que observou valor de perda total de massa em frutos de mamoeiro Golden e Gran Golden próximo a 8%. Essa diferença no valor da perda de água para as mesmas cultivares pode ser devida ao estágio de maturação dos frutos no momento da colheita. Neste trabalho os frutos foram coletados no estágio 2 enquanto que os frutos coletados pelo autor citado estavam no estágio 1.

Viegas (1992), avaliou a perda de água em frutos de mamoeiro da cv. Sunrise Solo e da cv. Formosa, observando que os frutos de Sunrise apresentaram valores de perda de massa mais acentuados do que Formosa e a partir do 6º dia após a colheita, começaram a surgir os primeiros sinais de murcha do fruto e falta de brilho na casca. A diferença entre as cultivares foi atribuída à espessura da casca uma vez que a casca dos frutos de Sunrise Solo é mais fina, provavelmente apresentando poucas camadas de cutina na parte externa da epiderme. No presente trabalho não se observou diferença na perda de água entre os frutos da cv. Golden e da cv. Gran Golden sugerindo a semelhança na espessura da casca de ambas as cultivares.

Além do estágio de maturação, fatores como as condições ambientais de temperatura e umidade relativa em que os frutos estavam armazenados podem ter interferido na diferença de perda de peso para a mesma cultivar. Segundo Paull e Chen (1989), a perda de água é resultante da difusão do vapor de água através da casca para o ambiente o que pode contribuir para a variação das taxas de perda de massa em frutos. Pode-

se citar a temperatura e a umidade relativa do ar dos locais onde os frutos estão estocados, bem como o tempo de exposição do fruto no ambiente e os cuidados dispensados na colheita (CONEGLIAN, 1994).

#### **4.3.2 Perda de firmeza**

A resistência ao manuseio do fruto é uma característica garantida pela firmeza que é um dos fatores avaliados pelos consumidores ao adquirir o produto. Frutos menos firmes apresentam uma textura que os consumidores associam ao seu envelhecimento (MANRIQUE e LAJOLO, 2004).

Sams (1999), definiu o termo textura ao conjunto de aspectos físicos, como a consistência ou firmeza da polpa, e aspectos sensoriais, conferidos pelo teor de açúcares e acidez. Não se deve confundir textura com firmeza, uma vez que, a firmeza é relacionada à deformação e desintegração do tecido vegetal quando submetido à aplicação de uma força e não leva em consideração os aspectos sensoriais.

Neste trabalho foi acompanhada a perda de firmeza dos frutos de mamão cv. Golden e Gran Golden, mostrada na Figura 19. Os frutos das cv. Golden e Gran Golden colhidos no estádio 2 amadureceram completamente com 5 dias após a colheita.

Observa-se que do 3<sup>o</sup> ao 4<sup>o</sup> dpc ocorreu a faixa crítica do amadurecimento do mamão. Nesse período, o fruto apresentou acentuadas mudanças visuais na coloração da casca e alterações na firmeza da polpa. O fruto passou de uma coloração amarelo-esverdeada para uma coloração completamente amarelada e tornou-se macio ao tato. Também observou-se uma queda de aproximadamente 60% na firmeza da polpa dos frutos. Supõe-se que a queda acentuada na firmeza desses frutos ocorra após o pico climatérico do amadurecimento.

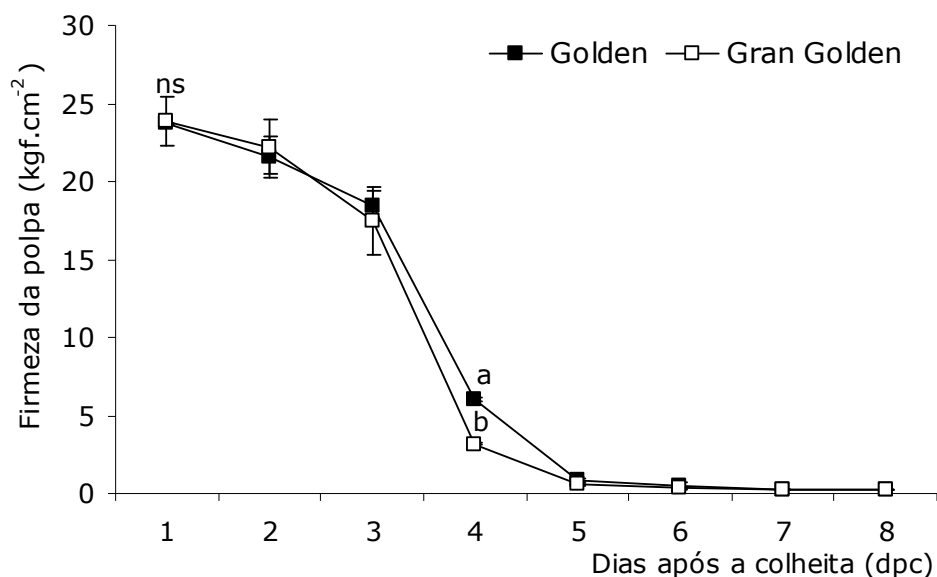


Figura 19– Comparação entre a perda de firmeza nos frutos de mamão, cultivares Golden e Gran Golden, durante 8 dias pós-colheita armazenados em temperatura ambiente a 25°C. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares determinada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns, Indica diferença não significativa entre as médias (n=9).

Ao se apalpar o mamão durante o amadurecimento, observa-se que os frutos de Gran Golden amadurecem e tornam-se menos firmes antes dos frutos de Golden. Este fato foi comprovado ao se medir diariamente a firmeza nos frutos dessas cultivares. Estatisticamente, a cv. Golden apresentou-se mais firme do que a cv. Gran Golden no 4º dpc, alcançando em média, 6,05 kgf.cm<sup>-2</sup> e 3,19 kgf.cm<sup>-2</sup>, respectivamente. A partir do 5º dpc quando se observam os menores valores de firmeza, em torno de 0,20 kgf.cm<sup>-2</sup>, os frutos alcançam o completo amolecimento da polpa.

Os resultados obtidos neste trabalho diferem daqueles encontrados por Ferraz (2005). Aquele autor observou que a alteração na firmeza dos frutos de mamão das cultivares Golden e Gran Golden é mais acentuada

do 5º para o 6º dia, perdendo completamente a textura (zero libras) a partir do 8º dia pós-colheita. Essa diferença nos resultados pode ser em decorrência do estágio de maturação no qual se encontravam os frutos no momento da colheita, uma vez que a colheita do mamão é feita baseada na coloração da casca, resultando em frutos com grande variação de estádios de maturação.

A perda de firmeza pós-colheita ocorre em frutos climatéricos tais como: pêra (LUTON et al., 1986), banana (ABU-GOUKH et al., 1995) e goiaba (ABU-GOUKH e BASHIR, 2003).

Souza (1998) relatou que independente da variedade e do estágio de maturação do fruto do mamoeiro, ocorre redução na firmeza da polpa durante o período pós-colheita. Balbino (1997) sugere que a perda de firmeza do fruto do mamoeiro está associada à perda diária de água por transpiração. Com isto o potencial hídrico nas células diminui, tornando-as menos túrgidas e conseqüentemente, contribuindo para a diminuição na firmeza da polpa. Assim, um teste de correlação entre esses parâmetros foi realizado e os resultados obtidos são apresentados na Figura 20.

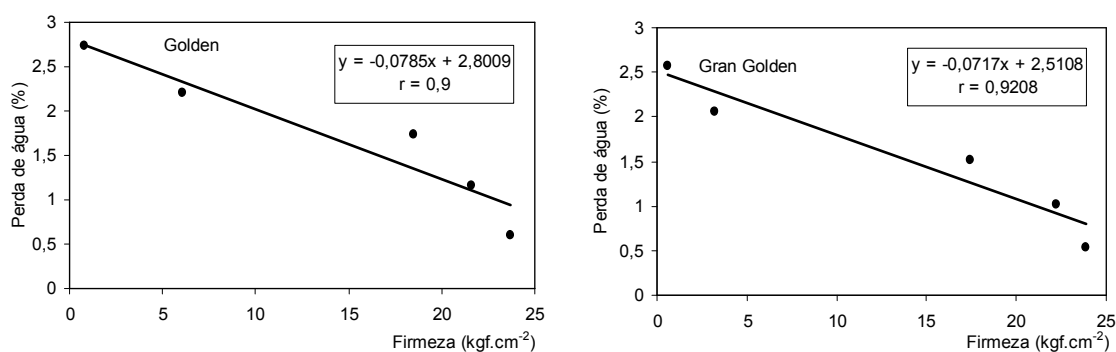


Figura 20 – Correlação entre a perda de água e a firmeza da polpa em frutos de mamão, cultivares Golden e Gran Golden.

Resultados semelhantes foram encontrados por Souza (1998). O autor destaca que a perda de água é mais acentuada em frutos aos 6 dias pós-colheita, quando estes são colhidos no estágio 3 (com 3 estrias longitudinais amarelas). Nesse período a firmeza da polpa alcançou valores próximo a  $1\text{kgf/cm}^2$ . Entretanto, vale destacar que o 6º dpc relatado por Souza (1998) é correspondente ao intervalo entre o 3º e o 4º dpc no presente trabalho, período em que os frutos encontravam-se em estágio de maturação não recomendado para comercialização em razão da dificuldade de manuseio do fruto.

#### **4.3.3 Atividade enzimática na polpa**

Outro aspecto estudado foi o papel de enzimas na redução da firmeza da polpa do mamão. Tal fenômeno, do ponto de vista bioquímico, é confirmado por Varoquaux e Wiley (1994) e Sigrist (2002), que afirmam serem as reações enzimáticas responsáveis pela perda de firmeza da polpa, bem como pelas deteriorações sensoriais como odor e sabor desagradável e alteração da cor da casca e da polpa.

As enzimas que participam no processo de desorganização da estrutura da parede celular avaliadas neste estudo foram a celulase, que degrada as microfibrilas de celulose, e a  $\beta$ -galactosidase, que remove os resíduos de galactose presentes na pectina, ambas contribuindo para o aumento do potencial hídrico na célula, levando à maciez do fruto.

##### **4.3.3.1 Celulase**

A Figura 21 mostra o perfil da atividade da celulase nos frutos do mamoeiro. Observou-se um aumento gradativo na atividade desta enzima até o 6º dpc na cv. Golden e até o 5º dpc na cv. Gran Golden. Posteriormente a esse período, a celulase alcançou atividade máxima em ambas as cultivares, mantendo-se estável.

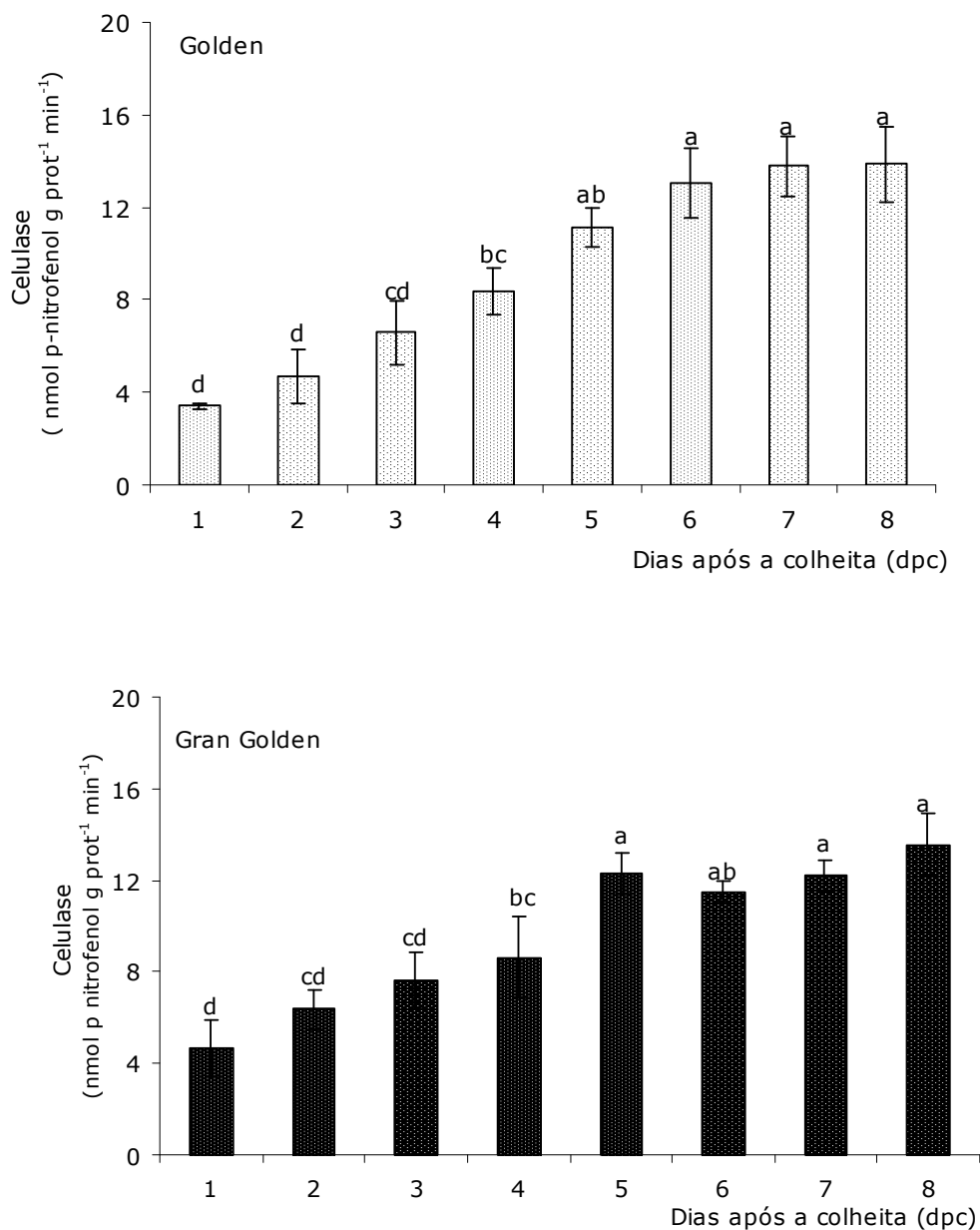


Figura 21- Perfil da atividade da enzima celulase durante os dias pós-colheita em frutos de mamão, cultivares Golden e Gran golden. A atividade foi expressa em nmol de p-nitrofenol liberado por grama de proteína por minuto. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os dias pós-colheita determinada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n=9).

Quando se comparou o perfil da atividade da celulase em ambas as cultivares (Figura 22), observou-se uma diferença significativa no 5º dpc. Esse resultado comprovou aquele apresentado na Figura 19 que demonstrou que Gran Golden apresenta menor firmeza da polpa.

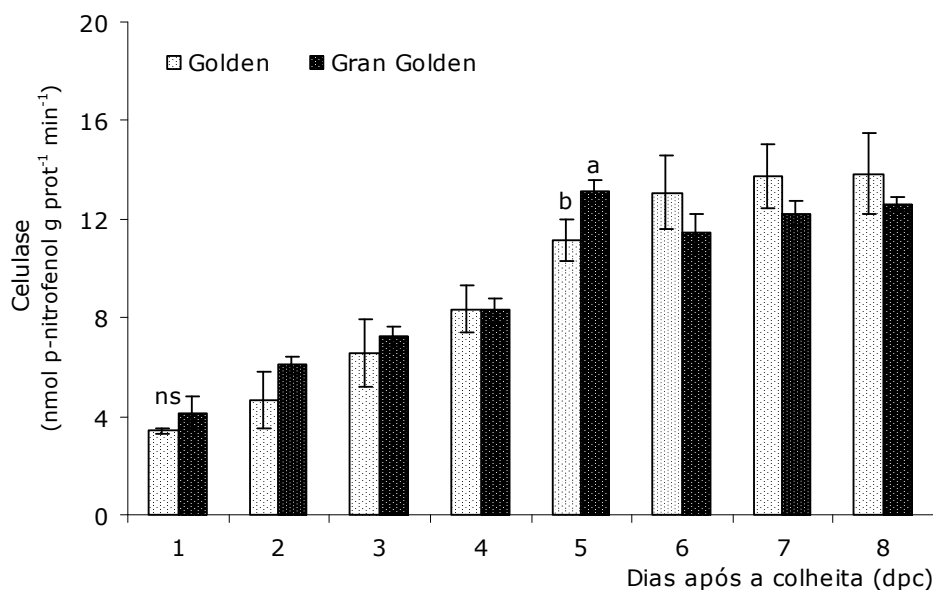


Figura 22 – Comparação da atividade da enzima celulase durante os 8 dias pós-colheita entre frutos de mamão, cultivares Golden e Gran Golden. A atividade foi expressa em nmol de p-nitrofenol liberado por grama de proteína por minuto. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares determinada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns, Indica diferença não significativa entre as médias (n=9).

Para ambas as cultivares existe uma estreita correlação entre firmeza e a atividade da celulase (Figura 23). A atividade da celulase foi inversamente proporcional à firmeza, ou seja, à medida que sua atividade aumentou durante o amadurecimento, a firmeza da polpa dos frutos diminuiu.

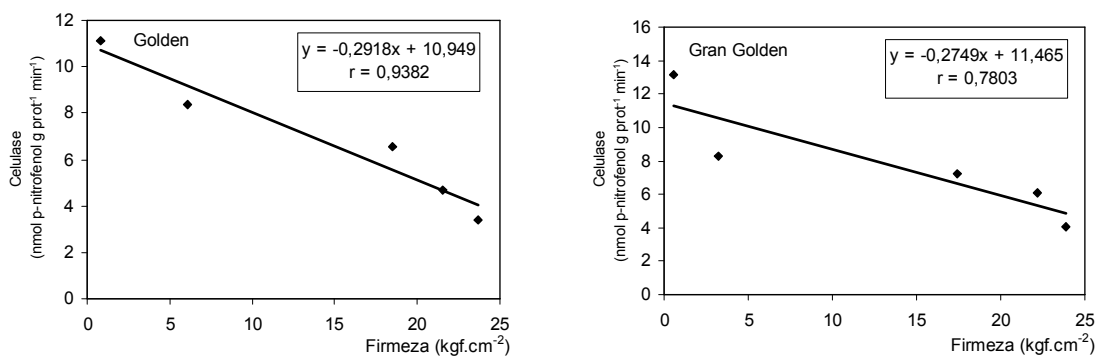


Figura 23 – Correlação entre a firmeza da polpa e a atividade da celulase em frutos de mamão, cultivares Golden e Gran Golden.

Estes resultados são semelhantes ao encontrado em carambola, por Chin et al. (1999), onde a atividade da celulase aumentou acompanhando um decréscimo gradativo na firmeza.

A atividade da enzima celulase está relacionada com a perda de firmeza na polpa dos frutos de mamão por contribuir com a degradação das microfibrilas de celulose da parede celular.

Alterações na firmeza são conseqüências de alterações nos polissacarídeos da parede celular que juntamente com a perda de água proporcionam a perda de firmeza dos frutos, fato que também foi constatada por Brownleader et al., (1999).

Observou-se uma correlação positiva entre a perda de água nos frutos de mamão e a atividade da celulase (Figura 24).



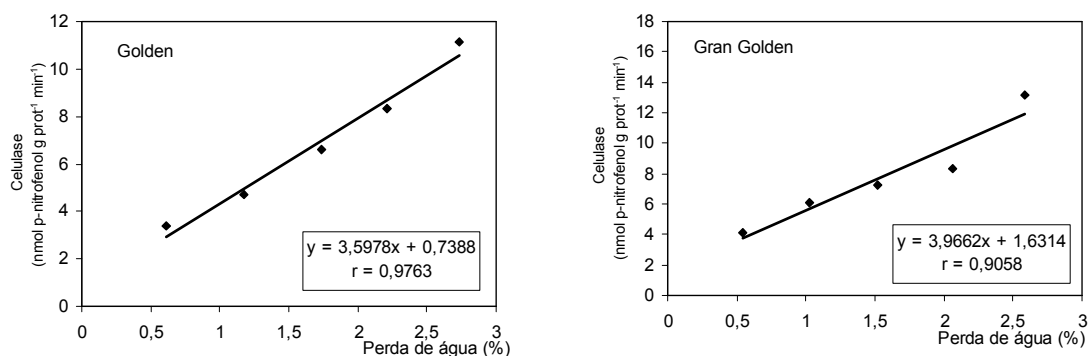


Figura 24 – Correlação entre a perda de água e a atividade da celulase em frutos de mamão, cultivares Golden e Gran Golden.

Gonzalez-Bosch et al., (1996) e Catalá et al. (2000), relataram a existência de diferentes genes (*LeCel/1*, *LeCel/2*, *LeCel/4* e *LeCel/7*) que levam à expressão da celulase durante o amadurecimento de tomate, supondo que estes genes são responsáveis pelo aumento da atividade da celulase. Giovanonni et al. (1989), ao trabalhar com abacate, observou que os genes *LeCel/1* e *LeCel/2* eram expressos quando se aplicava etileno exógeno. O mamão, por ser um fruto climatérico, apresenta síntese e acúmulo de etileno endógeno que provavelmente induz ao acúmulo de hidrolases de parede celular em paralelo com a expressão de outros processos de amadurecimento como modificações sensoriais.

As diferenças na expressão de genes relacionados à atividade de um conjunto de enzimas ou isoformas de uma mesma enzima no amadurecimento de frutos entre cultivares ou espécies são relatadas por Ali et al. (1998) e Chin et al. (1999).

Verifica-se portanto, que há necessidade de estudos futuros também para frutos de mamoeiro, que incluam a expressão gênica e aplicação de etileno, visando complementar o entendimento da dinâmica da atividade da celulase nestes frutos.

#### **4.3.3.2 $\beta$ -galactosidase**

O perfil da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase nas cultivares Golden e Gran Golden é apresentado na Figura 25. Observa-se que em ambas as cultivares ocorre um aumento da atividade no 5<sup>o</sup> dpc.

Resultados semelhantes foram obtidos por Lazan et al. (2004), cujo trabalho com mamão demonstrou um aumento na atividade da  $\beta$ -galactosidase durante o amadurecimento. Os autores afirmam que esta enzima não só modificou as pectinas como também as hemiceluloses da parede celular do fruto.

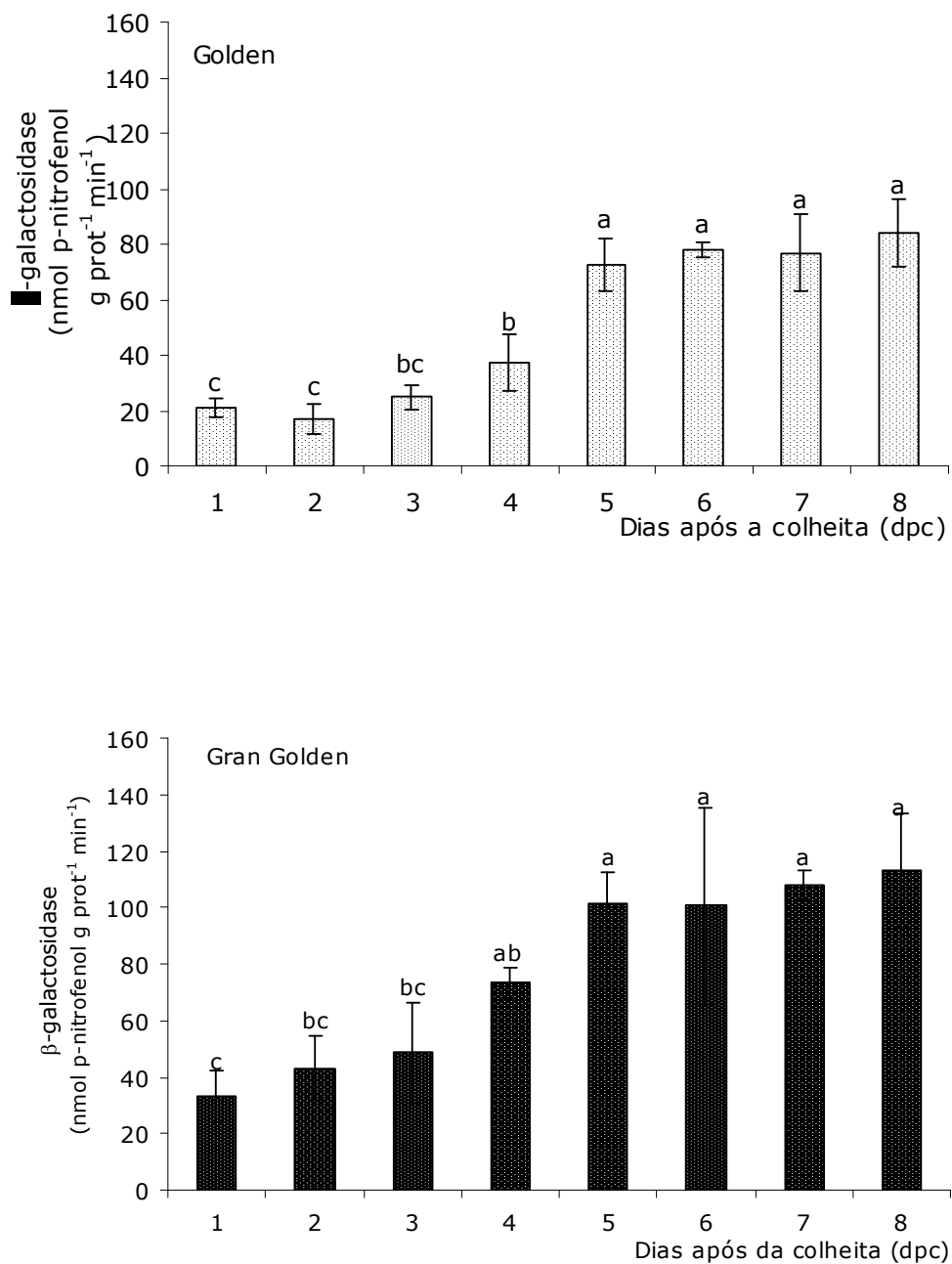


Figura 25- Perfil da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase durante os 8 dias pós-colheita em frutos de mamão, cultivares Golden e Gran Golden. A atividade foi expressa em nmol de p-nitrofenol liberado por grama de proteína por minuto. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os dias pós-colheita determinada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n=9).

A comparação do perfil da atividade da  $\beta$ -galactosidase nas duas cultivares estudadas é mostrada na Figura 26. Os resultados mostram que a atividade dessa enzima na cv. Gran Golden é estatisticamente diferente da cv. Golden.

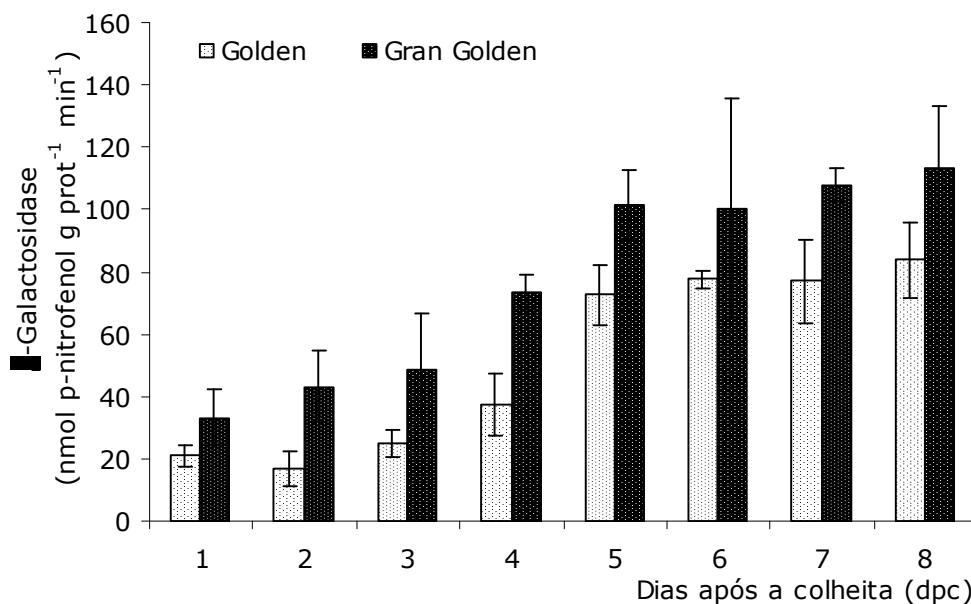


Figura 26– Comparação do perfil da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase durante 8 dias pós-colheita em frutos de mamão, cultivares Golden e Gran Golden. A atividade foi expressa em nmol de p-nitrofenol liberado por grama de proteína por minuto. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as cultivares determinada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n=9).

A atividade da  $\beta$ -galactosidase durante o amadurecimento dos frutos mostrou-se intimamente correlacionada à perda de firmeza no fruto (Figura 27). Este resultado aponta para a importância dessa enzima na degradação da parede celular e diminuição da firmeza da polpa dos frutos de mamão.

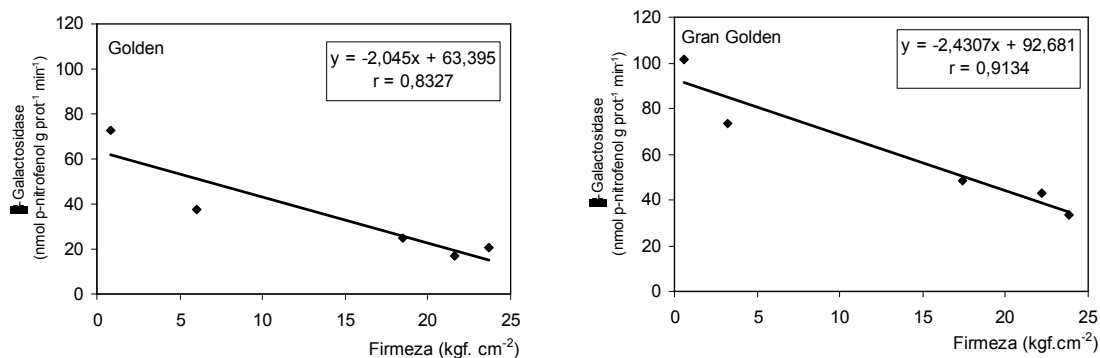


Figura 27 – Correlação entre a firmeza da polpa e a atividade da  $\beta$ -galactosidase em frutos de mamão, cultivares Golden e Gran Golden.

Resultados experimentais de diversos pesquisadores indicam a importância da ação das pectinases durante o amolecimento da polpa de frutos. Ketska e Daengkanit (1999), observaram um aumento na solubilização das pectinas e o decréscimo na firmeza de frutos de pêra. Segundo Ali et al. (1995), ao estudar a atividade da  $\beta$ -galactosidase em frutos de manga, observou que esta enzima estava correlacionada com o amolecimento da polpa.

Diversos estudos têm indicado também que a  $\beta$ -galactosidase estava atuando sobre os polímeros de galactose presentes na pectina resultando na perda de resíduos de galactose e arabinose durante o amadurecimento de Kiwi (REDGWELL et al., 1992), manga (MITCHAM e MacDONALD, 1992), tomate (CARRINGTON et al., 1993), melão (ROSE et al., 1998) e carambola (CHIN et al., 1999). Assim sendo, esse evento tem sido considerado comum nas modificações das pectinas de parede celular o que sugere que também possa ocorrer durante o amadurecimento do mamão.

Além dos dados relatados anteriormente pode-se observar que o aumento na atividade da  $\beta$ -galactosidase acompanhou a perda de água durante o processo de amadurecimento dos frutos estudados neste trabalho (Figura 28).

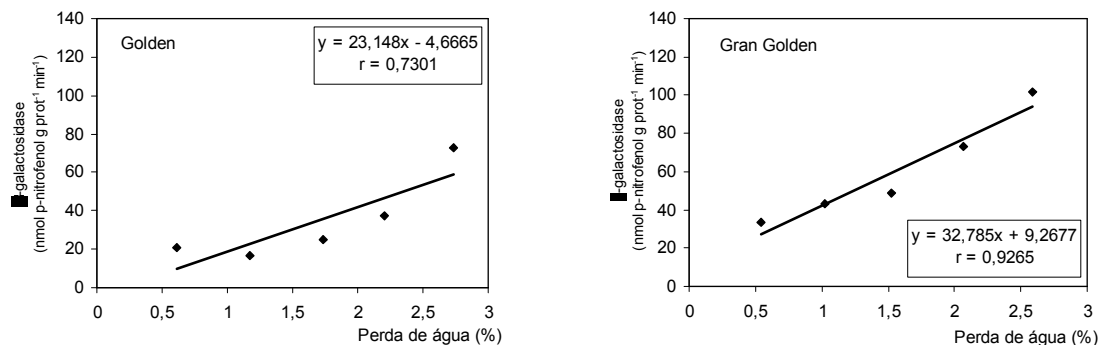


Figura 28 – Correlação entre a perda de água e a atividade da  $\beta$ -galactosidase em frutos de mamão, cultivares Golden e Gran Golden.

Resultados semelhantes foram encontrados por Ferraz (2005), quando trabalhou com frutos de mamão irradiados. O autor encontrou correlação significativa entre a atividade da  $\beta$ -galactosidase, a perda de água e a perda de firmeza na polpa.

Diversos trabalhos indicaram que o processo de perda de água do tecido provoca a diminuição no volume do vacúolo e conseqüente perda de turgescência da célula em resposta ao aumento na permeabilidade da membrana. Com a permeabilidade alterada, ocorre saída de ácidos orgânicos do apoplasto desestruturando as ligações entre polissacarídeos pécticos e íons  $\text{Ca}^{2+}$  disponibilizando substrato para as hidrolases pré-existentes na parede celular (LACAN e BACOU, 1996; ALMEIDA e HUBER, 1999; CHATENET et al., 2000).

Os dados gerados neste trabalho permitem sugerir que as hidrolases celulase e  $\beta$ -galactosidase contribuem para o processo de perda de água e conseqüente perda de firmeza nos frutos das cultivares Golden e Gran Golden. Também ficou evidente que existem diferenças na firmeza da polpa dos frutos das duas cultivares. Os resultados apontam que os frutos da cv. Gran Golden perdem a firmeza mais rapidamente do que os frutos da cv. Golden.

Verifica-se que existem ainda vastos temas para serem estudados, visando ampliar o entendimento sobre os mecanismos de controle de amadurecimento dos frutos do mamoeiro incluindo a perda de firmeza da polpa, enzimas de degradação da parede celular, regulação gênica associada aos fatores edafoclimáticos. Estes estudos contribuiriam para a elucidação dos problemas das perdas pós-colheita, ajudando na evolução mais rápida dos estudos com inibidores e retardantes do amadurecimento.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho observou-se que as variações de precipitação ocorrida no local de cultivo do mamoeiro influenciaram na eficiência da utilização da energia absorvida pelas clorofilas. Além disso, as análises da cinética de emissão de fluorescência da clorofila *a* mostram as diferenças entre as cultivares.

A cv. Golden apresentou maior taxa de dissipação de energia ( $DI_o/CS$ ) refletida num aumento da fluorescência inicial ( $F_o$ ), considerada um indicativo de estresse em plantas, e, diminuição da eficiência quântica do FSII. No entanto esses resultados foram compensados pela maior taxa de absorção de energia de excitação ( $ABS/CS$ ), captura de energia de excitação ( $TR_o/CS$ ) e transporte dessa energia ( $ET_o/CS$ ), o que possibilitou uma maior eficiência na utilização da energia luminosa no período de maior precipitação (mês de junho).

A cv. Gran Golden mostrou-se como a mais tolerante à menor precipitação ocorrida no período do inverno (mês de agosto) por ter apresentado um aumento na captura de energia por secção transversal ( $TR_o/CS$ ) e transporte dessa energia ( $ET_o/CS$ ), refletidos pelo aumento da eficiência quântica do FSII.

Os resultados das análises do amadurecimento do mamão mostraram que o início da perda de firmeza ocorreu no 3º dpc, sendo que, no 4º dpc houve diferença entre as cultivares. Os frutos da cv. Gran Golden perderam sua firmeza mais rapidamente que os frutos da cv. Golden. Essa perda de firmeza aconteceu após o aumento da atividade das enzimas estudadas. A atividade da celulase e da  $\beta$ -galactosidase também mostrou-se mais elevada nos frutos de Gran Golden.

Os resultados encontrados neste trabalho evidenciam a participação da celulase e  $\beta$ -galactosidase no processo de amolecimento da polpa do



mamão. Observou-se que, as análises da atividade dessas enzimas no período pós-colheita dos frutos podem auxiliar no entendimento da perda de firmeza nos frutos de diferentes cultivares e mostram que o estudo das enzimas de degradação de parede celular é capaz de esclarecer dúvidas fundamentais da fisiologia do amadurecimento do mamão.

## 6. REFERÊNCIAS

ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALVEIT, M. E. **Ethylene in plant biology**. 2ed. London: Academic Press. 1992. p.414.

ABU-SARRA, A. F.; ABU-GOUKH, A. A. Changes in the pectinesterase, poligalacturonase e cellulase activity during mango fruit ripening. **Journal of horticultural science**, v.67, n.4, 561-568, 1992.

ABU-GOUKH, A. A.; BASHIR, H. A. Changes in pectic enzymes and cellulase activity during guava fruit ripening. **Food chemistry**, v.83, p.213-218, 2003.

ABU-GOUKH, A. A.; IBRAHIM, K. E.; YUSUF, K. S. A comparative study of banana fruit quality and acceptability under different ripening conditions in Sudan. **University of Khartoum Journal of Agricultural Sciences**, v.3, n.2, p.32-48, 1995.

ALEXANDER, L.; GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.377, 2002.

ALI, Z. A.; ARMUGAM, S.; LAZAN, H. b-galactosidase and its significance in ripening mango fruit. **Phytochemistry**, v.38, n.5, p.1109-1114, 1995.

ALI, Z. M.; NG, S.-Y.; OTHMAN, R.; GOH, L.-Y.; LAZAN, H. Isolation, characterization and significance of papaya b-galactanases to cell wall modification and fruit softening during ripening. **Physiologia Plantarum**, v.104, p.105-115, 1998.

ALMEIDA, D. P. F.; HUBER, D. J. Apoplastic pH and inorganic ions levels in tomato fruit: a potential means for regulation of cell wall metabolism during ripening. **Physiologia Plantarum**, v.105, p.506-512, 1999.

ALMEIDA, F. T. de; BERNARDO, S.; FERNANDES, E.; MARIN, S. L. D.; GRIPPA, S. Growth and yield of papaya under irrigation. **Scientia Agricola**, v.60, n.3, p.419-424, 2003.

AMARO, A. A.; CASER, D. V. Análise conjuntural do mercado de mamão – aspectos econômicos da comercialização. In: MARTINS, D. dos S. **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória, ES: Incaper, 2003. Cap.2, p.37-53, 714p.

ANDRIGUETO, J. R.; KOSOSKI, A. R. Desenvolvimento e conquistas da produção integrada de frutas no Brasil até o ano de 2004. In: MARTINS, D. dos S. **Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão**. Vitória, ES: Incaper, 2005. Cap.6, p.81-90, 666p.

APPENROTH, K. J.; STÖCKEL, J.; SRIVASTAVA, A.; STRASSER, R. J. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrrhyza* as probed by OJIP chlorophyll fluorescence measurements. **Environmental Pollution**, v.115, p.49-64, 2001.

ARCHBOLD, D. D.; POMPER, K. W. Ripening pawpaw fruit exhibit respiratory and ethylene climacterics. **Postharvest Biology and Technology**, v.30, p.99-103, 2003.

BAKER, N. R. A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. **Physiologia Plantarum**, v.81, p.563-570, 1991.

BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.403, p.1607-1621, 2004.

BALASUBRAMANIAM, S.; LEE, H. C.; LAZAN, H.; OTHMAN, R.; ALI, Z. M. Purification and properties of a  $\beta$ -galactosidase from carambola fruit with significant activity towards cell wall polysaccharides. **Phytochemistry**, v.66, p.153-163, 2005.

BALBINO, J. M. S. Efeitos da hidrotermia, refrigeração e ethephon na qualidade pós-colheita do mamão (*Carica papaya* L.). **Tese de Doutorado**. Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, 1997. 104p.

BARBAGALLO, R. P.; OXBOUROUGH, K.; PALLETT, K. E.; BAKER, N. R. Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. **Plant Physiology**, v.132, p.485-493, 2003

BARTLEY, I.M.; KNEE, M. The chemistry of textural changes in fruit during storage. **Food Chemistry**, v.9, p.47-58. 1982.

BEHERA, R. K.; CHOUDHURY, N. K. High irradiance induced pigment degradation and loss of photochemical activity of wheat chloroplasts. **Biologia Plantarum**, v. 45, n. 1, p.45-49, 2002.

BERTIN, P.; KINET, J. M.; BOUHARMONT, J. Evaluation of chilling sensitivity in different rice varieties. Relationship between screening procedures applied during germination and vegetative growth. **Euphytica**, v.89, p. 201-210, 1996.

BIGGS, M. S.; HARRIMAN, R. W.; HANDA, A. K. Changes in gene expression during fruit ripening. **Plant Physiology**, v.81, p.395-403, 1986.

BOTEON, M. Desafios da fruticultura e o mercado de mamão. In: MARTINS, D. dos S. **Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão**. Vitória, ES: Incaper, 2005. Cap.1, p.15-22, 666p.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; OQUIST, G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D.O. et al. **Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual**. London: Chapman & Hall. 1993. Cap.12, p. 193-206.

BRAPEX – **Associação Brasileira de Exportadores de Papaya** [on line]. Disponível:<http://www.brapex.net> [acesso em novembro de 2005]

BRETT, C. T.; WALDRON, K. W. **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls**. 2 ed. London:Chapman e Hall. 1996. 255p.

BROWNLEADER, M. D.; JACKSON, P.; MOBASHERI, A.; PANTELIDES, A. T.; SUMAR, S.; TREVAN, M.; DEY, P. M. Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. **Critical reviews in food science and nutrition**, v.39, n.2, p.149-164, 1999.

BRUMMELL, D. A.; HARPSTER, M. H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, v.47, p.311-340, 2001.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; RUSSELL, J. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. EUA: American Society of Plant Physiologists. 2000. Cap.2, 1367p.

BUKHOV, N. G.; EGOROVA, E. A.; GOVINDACHARY, S.; CARPENTIER, R. Changes in polyphasic chlorophyll *a* fluorescence induction curve upon inhibition of donor or acceptor side of photosystem II in isolated thylacoids. **Biochemica et Biophysica Acta**, v.1657, p.121-130, 2004.

CAMPBELL, P.; BRAAM, J. Xyloglucan endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. **Trends in Plant Science**, v.4, p.361-366, 1999.

CAMPOSTRINI, E.; POSSE, S. C. P.; SILVA, R. F. da; NETTO, A. T. Eficiência fotoquímica, medidas biométricas e leituras do medidor portátil de clorofilas (SPAD-502) em mudas de mamoeiro "Formosa" cultivadas em dois volumes de recipientes de cultivo. **Anais do I Simpósio do Papaya Brasileiro** – qualidade do mamão para o mercado interno, p.413-416, 2003.

CAREY, A. T.; HOLT, K.; PICARD, S.; WILDE, R.; TUCKER, G. A.; BIRD, C. R.; SCHUCH, W.; SEYMOUR, G. B. Tomato exo-1-4-b-D-galactanase: isolation, changes during ripening in normal and mutant tomato fruit, and characterization of a related cDNA clone. **Plant Physiology**, v.108, p.1099-1107, 1995.

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

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

CARVALHO, P. G. B. Efeito da temperatura na germinação e nas atividades de endo b-mananase e de CM-celulase em sementes de *Sesamum indicum* L. **Tese de doutorado**. Brasília: Universidade de Brasília, 2001. 78p.

CASTRO, F. A.; CAMPOSTRINI, E.; BORTOT, P. de A.; LIMA, E. C.; AZEVEDO, L. da C.; SOUZA, M. A. otimização das interpretações das leituras do medidor portátil de clorofilas (SPAD-502): Possibilidades do uso na avaliação do processo fotossintético em folhas de *Carica papaya* L. **Anais do XXII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal**. Recife, PE. 2005.

CASTRO, F. A.; CAMPOSTRINI, E.; CHIQUERI, T. B.; REIS, F. O.; NETO, A. T.; GOMES, M. M. A.; SANTOS, A. M.; AZEVEDO, L. C. Estresse hídrico em mudas de mamoeiro "Golden": efeitos sobre a fotoquímica da fotossíntese. **Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Fruticultura**, Florianópolis, SC. 2004.

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

CHATENET, C.; LATCHE, A.; OLMOS, E.; RANTY, B.; CHARPENTEAU, M. Espatial resolved analysis of hystological and biochemical alterations

induced by water-soaking in melon fruit. **Physiologia Plantarum**, v.110, p.248-255, 2000.

CHIN, L. H.; ALI, Z. M.; LAZAN, H. Cell wall modifications, degrading enzymes and softening of carambola fruit during ripening. **Journal of Experimental Botany**, v.50, n.335, p.767-775, 1999.

CHITARRA, M.I.; CHITARRA, A.D. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: Fisiologia e Manuseio**. Lavras: ESAL/FAEPE. 1990. 293p.

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

CONEGLIAN, R. C. Efeitos da refrigeração, fungicida e de alguns reguladores na fisiologia pós-colheita de mamão (*Carica papaya* L.) cv. Solo. **Tese de doutorado**. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 1994. 143p.

COSGROVE, D.J. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, 2000.

COSGROVE, D. J. Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. **Plant Physiology**, v.125, p.131-134, 2001.

COSTA, E. S.; BRESSAN-SMITH, R.; OLIVEIRA, J. G.; CAMOSTRINI, E. Chlorophyll *a* fluorescence analysis in response to excitation irradiance in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. and *Vigna unguiculata* L. Walp) submitted to high temperature stress. **Photosynthetica**, v. 41, n.1, p.77-82, 2002.

CROOKES, P. R.; GRIERSON, D. Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isozymes in cell wall degradation. **Plant Physiology**, v.72, p.1088-1093, 1983.

DeELL, J. R.; TOIVONEN, P. M. A. Chlorophyll fluorescence as a nondestructive indicator of broccoli quality during storage in modified atmosphere packaging. **HortScience**, v.35, p.256-259, 2000.

DELMER, D. P.; AMOR, Y. Cellulose biosynthesis. **Plant Cell**, v.7, p.987-1000, 1995.

de VEAU, E. J. I.; GROSS, K. C.; HUBER, D. J.; WATADA, A.E. Degradation and solubilization of pectin by  $\beta$ -galactosidase purified from avocado mesocarp. **Physiologia Plantarum**, v.87, p.279-288, 1993.

EL-ZOGHBI, M. Biochemical changes in some tropical fruits during ripening. **Food Chemistry**, v.49, p.33-37, 1994.

FENG, X., APELBAUM, A., SISLER, E. C., GOREN, R. Control of ethylene responses in avocado fruit with 1-methylcyclopropene. **Postharvest Biology and Technology**, v.20, p.143-150, 2000.

FERRAZ, K. K. Avaliação das características físicas, bioquímicas e organolépticas e efeito da radiação gama na conservação pós-colheita dos frutos de mamão (*Carica papaya* L.). **Dissertação de Mestrado**. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo. 2005. 110p.

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

FONTES, R. V. Eficiência fotoquímica das plantas e atividade da enzima pectinametilesterase na polpa de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Dissertação de Mestrado**. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, 2005. 63p.

FORCE, L.; CRITCHLEY, C.; VAN RENSEN, J. J. S. New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. 1. The effect of illumination on the fluorescence parameters of the JIP-test. **Photosynthesis Research**, v.78, p.17-33, 2003.

FRACHEBOUD, Y.; HALDIMANN, P.; LEIPNER, J.; STAMP, P. Chlorophyll fluorescence as a selection tool for cold tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.50, p. 1533-1540, 1999.

GEORGIEVA, K.; YORDANOV, I. Temperature dependence of chlorophyll fluorescence in pea thylacoid membranes. **Journal of Plant Physiology**, v. 142, p. 151-155, 1993.

GIBEAUT, D.M.; CARPITA, N.C. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. **FASEB Journal**, v.8, p.904-915. 1994.

GILMORE, M. A.; BJORKMAN, O. Adenine nucleotides and the xanthophylls cycle in leaves. II. Comparison of the effects of CO<sub>2</sub> and temperature limited photosynthesis on photosystem II fluorescence quenching, the adenylate energy charge and violaxanthin de-epoxidation in cotton. **Planta**, v.192, p. 537-544, 1994.

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

GONÇALVES, M. C.; VEGA, J.; OLIVEIRA, J. G.; GOMES, M. M. A. Sugarcane yellow leaf virus infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves. **Fitopatologia brasileira**, v.30, n.1, p.10-16, 2005.

GONZALEZ-BOSCH, C.; BRUMMELL, D. A.; BENNETT, A. B. Differential expression of two endo-1,4- $\beta$ -glucanase genes in pericarp and locules of wild-type and mutant tomato fruit. **Plant Physiology**, v.111, p.1313-1319, 1996.

GOMES, F. B.; GALON, C. Z.; LOPES, F. P.; FONTES, R. V.; SILVA, D. M. Variações diurnas da fotossíntese em mudas de *Carica papaya* L. **Anais do I Simpósio do Papaya Brasileiro** – qualidade do mamão para o mercado interno, p.430-433, 2003.

GOVINDJEE Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll *a* fluorescence. **Journal of Plant Physiology**, v. 22, p.131-160, 1995.

GROSS, K. C.; SAMS, C. E. Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. **Photochemistry**, v.23, p.2457-2461, 1984.

HAGERMAN, A. E.; AUSTIN, P. J. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. **Journal of agricultural food chemistry**, v.34, p.440-444, 1986.

HALDIMANN, P.; STRASSER, R. J. Effects of anaerobiosis as probed by the polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise kinetic in peã (*Pisum sativum* L.) **Photosynthetica Research**, v. 62, p. 67-83, 1997.

HARDENBURG, R. E.; WATADA, A. E.; WANG, C. Y. **Agricultural Handbook**: The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks. Betsville: U.S. Department of Agriculture , 1986. 136p.

HUBER, D.J. Polyuronide degradation and hemicelulose modifications in ripening tomato fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.108, n.3, p.405-409. 1983.

HUBER, D. J. The role of the cell wall hydrolases in fruit softening. **Horticultural Review**, v.5, p.169-219, 1983.

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

JACKMAN, R. L; STANLEY, D. W. Perspectives in the textural evaluation of plant foods. **Trends Food Science and Technology**, v.6, p.187-194, 1995.

JARVIS, M. C. Structure and properties of pectin gell in plant cell walls. **Plant Cell Environmental**, v.7, p.153-164, 1984.

KARAKURT, Y.; HUBER, D. J. Cell wall-degrading enzymes and pectin solubility and depolymerization in immature and ripe watermelon

(*Citrullus lanatus*) fruit in response to exogenous ethylene. **Physiologia Plantarum**, v.116, p.398-405, 2002.

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

KASHYAP, D.R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**. v.77, 2001.

KAUTSKY, H.; Fluoreszenzenkurven von chloroplasten-grana. **Naturwissenschaften**, v.29, p.101-102, 1941.

KEEGSTRA, K; TALMADGE, K. W.; BAUER, W. D.; ALBERSHEIM, P. A model to cell wall structure. **Plant Physiology**, v.51, p.188-196, 1973.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. 452p.

KETSA, S.; DAENGGANIT, T. Firmness and activities of polygalacturonase, pectinesterase,  $\beta$ -galactosidase and cellulase in ripening durian harvested at different stages of maturity. **Scientia Horticulturae**, v.80, p.181-188, 1999.

KOH, T. H.; MELTON, L. D. Analysis of papaya cell wall polysaccharides. **Asean Food**, v.9, p.101-106, 1994.

KONNO, H.; NAKASHIMA, S.; NAKATO, T; KATOH, K. Pectin-bound  $\beta$ -galactosidase present in cell walls of carrots cells under the different calcium status. **Physiologia Plantarum**, v.114, p.213-222, 2002.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 313-349, 1991.

KRÜGER, G. H. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in camelia leaves. **Physiologia Plantarum**, v.101, p.265-277, 1997.

LACAN, D.; BACCOU, J. C. Changes in lipids and electrolyte leakage during nonnetted muskmelon ripening. **Journal American Society and Horticultural Science**, v.121, p.554-558, 1996.

LAJOLO, M. G.; CORDENUNSI, B. Evolution of soluble sugars during ripening of papaya fruit and its relation to sweet taste. **Journal of Food Science**, v.67, n.1, p.442-447, 2002.



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

LICHTENTHALER, H. K.; BURKART, S.; SCHINDLER, C.; STOBER, F. Changes in photosynthetic pigments and *in vivo* chlorophyll fluorescence parameters under photoinhibitory growth conditions. **Photosynthetica**, v.27, p.343-353, 1992.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C.; KNAPP, M. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and chlorophyll fluorescence decrease ratio  $R_{fd}$  of leaves with the PAM fluorometer. **Photosynthetica**, v.43, n.3, p.379-393, 2005.

LIU, X. F.; YAN, H. C.; WANG, K. B.; KUANG, T. Y.; ZHANG, J. P.; GUI, L. L., NA, X. M., CHANG, W. R. Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 angstrom resolution. **Nature**, v.428, p. 287-292, 2004.

LOHANI, S., TRIVEDI, P. K., NATH, P. Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. **Postharvest Biology and Tecnology**, v.31, p.119-126, 2004.

LOWRY, O.H.; ROSERBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. **Journal of Biology Chemistry**, v.193, p.262-267, 1951.

LUTON, M. T.; HOLLAND, D. A. The effect of preharvest factors on the quality of stored "Conference" pears. **Journal of Horticultural Science**, v.61, p.23-32, 1986.

MANRIQUE, G. D.; LAJOLO, F. M. Cell-wall polysaccharide modifications during postharvest ripening of papaya fruit (*Carica papaya*). **Postharvest Biology and Technology**, v.33, p.11-26, 2004.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, Cap.4, 2005. p.219-227.

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

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. M. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v.51, n.345, p.659-668, 2000.

MITCHAM, E. J.; McDONALD, R. E. Cell wall modification during ripening of 'Keitt' and 'Tomy Atkins' mango fruit. **Journal for the American Society of Horticultural Science**, v.117, p.919-924, 1992.

MOYA-LEÓN, M. A.; MOYA, M.; HERRERA, R. Ripening of mountain papaya (*Vasconcellea pubescens*) and ethylene dependence of some ripening events. **Postharvest Biology and Technology**, v.34, p.211-218, 2004.

NERBAUER, U.; SCHREIBER, U. The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: I. Saturation characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side. **Z. naturforsch**, v.42, p.1246-1254, 1987.

OECHSLIN, R. LUTZ, M.V., AMADÒ, R. Pectic substances isolated from apple cellulosic residue: structural characterization of a new type of rhamnogalacturonan I. In: Carbohydrate Polymers. V.51, 2003.

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

PAULL, R. E.; CHEN, N. J. Waxing and plastic wraps influence water loss from papaya fruit during storage and ripening. **Journal of American Society and Horticultural Science**, v.114, p.937-942, 1989.

PESIS, E.; FUCHS, Y.; ZAUBERMANN, G. Cellulase activity and fruit softening in avocado. **Plant physiology**, v.61, p.416-419, 1978.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 13ed. Piracicaba: Nobel, p.467, 1990.

PRABHA, T. N.; BHAGYALAKSHIMI, N. Carbohydrate metabolism in ripening banana fruit. **Phytochemistry**, v.48, n.6, p.915-919, 1998.

REDGWELL, R. J.; MELTON, L. D.; BRASCH, D. J. Cell wall dissolution in ripening kiwifruit (*Actinia deliciosa*). Solubilization of the pectic polymers. **Plant Physiology**, v.98, p.71-81, 1992.

REITER, W-D. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.536-542, 2002.

RIBEIRO, R. V.; MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F. de; PIMENTEL, C. High temperature effects on the response of photosynthesis to light in sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15, n.2, p.89-97, 2003.

RIBEIRO-JÚNIOR, J. I. **Análises estatísticas no Excel**: guia prático. Viçosa:UFV. 2004. Cap. 4, 251p.

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

ROSE, J. K. C.; HADFIELD, K. A.; LABAVITCH, J. M.; BENNETT, A. B. Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. **Plant Physiology**, v.117, p.345-361, 1998.

ROSS, G. S.; WEGRZYN, T.; MacRAE, E. A.; REDGWELL, R. J. Apple  $\beta$ -galactosidase: activity against cell wall polysaccharides and characterization of a related cDNA clone. **Physiologia Plantarum**, v.106, p.521-528, 1994.

SACKEL, K. A.; GREVE, C.; LABAVITCH, J. M.; AHMADI, H. Cell turgor changes associated with ripening in tomato pericarp tissue. **Plant Physiology**, v.97, p.814-816, 1991.

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

SCHREIBER, U. Chlorophyll fluorescence yield changes as a tool in plant physiology. I. The measuring system. **Photosynthesis Research**, v. 4, p. 361-373, 1983.

SCHREIER, P.; HARTMANN-SCHREIER, J. Properties of  $\beta$ -glucosidase from *Carica papaya* fruit. **Food Chemistry**, v.26, p.201-212, 1987.

SEAG – **Secretaria de Agricultura do Espírito Santo** [on line]. Disponível:<http://www.seag.es.gov.br> [acesso em Janeiro de 2006]

SEXTON, A.; PALMER, A. Cellulase, fruit softening and abscission in red raspberry *Rubus idaeus* L. Cv Glen Clova. **Annals of Botany** 80, 371-376, 1997.

SELVENDRAN, R.R. The chemistry of plant cell walls. In: Dietary Fibre. Londres, Applied Science Publishers, 1983.

SEYMOUR, G. B.; GROSS, K. C. Cell wall disassembly and fruit softening. **Postharvest News Information**, v.7, p.45-52, 1996.

SIGRIST, J. M. M. Estudos fisiológicos e tecnológicos de couve-flor e rúcula minimamente processadas. **Tese de doutorado**. São Paulo: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2002. 125p.

SOH, C. P.  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidases in papaya fruit softening during ripening. **Tese de doutorado**. 2002. Malásia: Universiti kebangsaan Malaysia.

SOUZA, G. Características físicas, químicas e sensoriais do fruto de cinco cultivares de mamoeiro (*Carica papaya* L.) produzidas em Macaé, RJ.

**Tese de Mestrado.** Rio de Janeiro: Universidade Federal Norte Fluminense, 1998. 87p.

SOLE, H.; BOTTGER, M. Mechanism of auxin-induced cell wall extension. **Plant Physiology**, v.67, p.127. 1981.

SRIVASTAVA, A.; GUISSÉ, B.; GREPPING, H.; STRASSER, R. J. Regulation of antenna structure and electron transport in PSII of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient: OKJIP. **Biochemical and Biophysical Acta**, v.1320, p.95-106, 1997.

SRIVASTAVA, A.; STRASSER, A. Stress and stress management of land plants during a regular day. **Journal of Plant Physiology**, v.148, p.445-455, 1996.

SRIVASTAVA, A.; STRASSER, R. J.; GOVINDJEE. Greening of peas: parallel measurements of 77K emission spectra, OJIP chlorophyll *a* fluorescence transient, period four oscillation of the initial fluorescence level, delayed light emission, and P700. **Photosynthetica**, v.37, n.3, p.365-392, 1999.

STRASSER, R. J. The grouping model of plant photosynthesis. In: AKAYUNOGLU, G.; ARGYROUDI, J. **Chloroplast development**. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical. 1978. p.523-524

STRASSER, R. J. The grouping model of plant photosynthesis: Heterogeneity of photosynthetic units in thylakoids. In: AKAYUNOGLU, G. **Photosynthesis**. Philadelphia: Balaban International Science Services. 1981. Cap.3, p.727-737.

STRASSER, R. J. Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients. **Photosynthesis Research**, v.52, p.147-155, 1997.

STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. The fluorescence transient as a tool to characterise and screen photosynthetic samples. In: YUNUS, M. et al. **Probing photosynthesis: mechanism, regulation and adaptation**. Bristol: Taylor & Francis. 2000. Cap.25, p.445-483.

STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; GOVINDJEE. Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. **Photochemistry and Photobiology**, v. 61, p. 32-42, 1995.

STRASSER, R. J.; GOVINDJEE. The Fo and the O-J-I-P fluorescence rise in higher plants and algae. In: ARGYROUDI, J. H. **Regulation of chloroplast biogenesis**. New York: Plenum Press. 1992. p.423-426.

STRASSER, R. J.; STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test. In: MATHIS, P., **Photosynthesis: from light to biosphere**. Netherlands: Kluwer Academic Publisher. 1995. Cap. 5, p.977-980.

STRASSER, R. J.; SRIVATAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. The fluorescence transient as a tool to characterise and screen photosynthetic samples. In: YUNUS, M. et al. **Probing photosynthesis: mechanism, regulation and adaptation**. Bristol: Taylor & Francis. 2000. Cap.25, p.445-483.

STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; GOVINDJEE Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. **Photochemistry and Photobiology**, v. 61, p. 32-42, 1995.

STRAUSS, A. J.; KRÜGER, G. H. S.; STRASSER, R. J.; VAN HEERDEN, P. D. R. Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotype probed by the chlorophyll *a* fluorescence transient O-J-I-P. **Environmental and Experimental Botany**, 2005. *in press*

TAKAHASHI, S.; TAMASHIRO, A.; SAKIHAMA, Y.; YAMAMOTO, Y.; KAWAMITSUE, Y.; YAMASAKI, H. High-susceptibility of photosynthesis to photoinhibition in the tropical plant *Ficus microcarpa* L. F. cv. Golden leaves. **BMC Plant Biology**. [www.biomedcentral.com/1471-2229/2/2](http://www.biomedcentral.com/1471-2229/2/2), 2002.

TUCKER, G.A.; GRIERSON, D. **Fruit Ripening**. In: The Biochemistry of Plants. London: Academic Press. 1987. Cap.8, p. 265–318.

TUCKER, M. L.; LATIES, G. G. Interrelationship of gene expression, polysome prevalence, and respiration during ripening of ethylene and/or cyanide-treated avocado fruit. **Plant Physiology**, v.74, p.307-315, 1984.

VAN HEERDEN, P. D. R.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; KRUGER, G. H. J.; STRASSER, R. J. Dark chilling effects on soybean genotypes during vegetative development: parallel studies of CO<sub>2</sub> assimilation, chlorophyll *a* fluorescence kinetics O-J-I-P and nitrogen fixation. **Physiologia Plantarum**, v. 117, p. 476-491, 2003.

VAN HEERDEN, P. D. R.; STRASSER, R. J.; KRUGER, G. H. J. Reduction of dark chilling stress in N<sub>2</sub>-fixing soybean by nitrate as indicated by chlorophyll *a* fluorescence kinetics. **Physiologia Plantarum**, v.121, p.239-249, 2004.

VAROQUAUX, P.; WILEY, R. C. Biological and biochemical changes in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. In: WILEY, R.C. (Ed.) **Minimally processed refrigerated fruits & vegetables**. New York: Chapman and Hall, 1994. Cap.6, p.226-268.

VIEGAS, P. R. A. Características químicas e físicas do mamão (*Carica papaya* L.) cultivares Sunrise Solo e Formosa relacionadas ao ponto de colheita. **Tese de mestrado**. Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, 1992. 82p.

VILELA, A. E.; RAVETTA, D. A. The effect of radiation on seedling growth and physiology in four species of *Prosopis* L. (Mimosaceae). **Journal Arid Environmental**, v.44, n.4, p.415-423, 2000.

WATADA, A.E.; HERNER, R.C.; KADER, A.A.; ROMANI, R.J.; STABY, G.L. Terminology for the description of developmental stages of horticultural crops. **HortScience** v.19, n.1, p.20-21, 1984.

WAKABAYASHI, K. Changes in cell wall polysaccharides during fruit ripening. **Journal of Plant Research**, v.113, p.231-237, 2000.

WILLIS, R.; McGLASSON, B.; GRAHAM, D.; JOYCE, D. **Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales**. Trad. De J. B. Gonzáles. 2ed. Zaragoza: Acribia. 1998. 240p.

XU, D. Q.; CHEN, X. M.; Zhang, L. X. et al. Leaf photosynthesis and chlorophyll fluorescence in a chlorophyll-deficient soybean mutant. **Photosynthetica**, v.29, n. 1, p.103-112, 1993.