

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

SABRINA GARCIA BROETTO

**RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO GÊNICA E A ATIVIDADE DE ENZIMAS
PECTINOLÍTICAS NA FIRMEZA DA POLPA DO MAMÃO GOLDEN**

**Vitória
2009**

SABRINA GARCIA BROETTO

**RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO GÊNICA E A ATIVIDADE DE ENZIMAS
PECTINOLÍTIICAS NA FIRMEZA DA POLPA DO MAMÃO GOLDEN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Vegetal, Área de Concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Diolina Moura Silva.

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Valéria de Oliveira Fernandes

Vitória
2009

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

Broetto, Sabrina Garcia, 1984-

B865r Relação entre a expressão gênica e a atividade de enzimas pectinolíticas na firmeza da polpa do mamão Golden / Sabrina Garcia Broetto. – 2009.

54 f. : il.

Orientadora: Diolina Moura Silva.

Co-Orientadora: Valéria de Oliveira Fernandes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Pectinametilesterase. 2. Pectinase. 3. Pós-colheita. 4. Mamão. I. Silva, Diolina Moura. II. Fernandes, Valéria de Oliveira. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

Dados de catalogação

Dedico
**Aos meus pais, pela vida,
pela oportunidade e
incentivo**

Agradecimentos

A Deus acima de todas as coisas, pelo dom da vida e pela presença fortificante no dia-a-dia, guiando meus passos e me concedendo serenidade;

Aos meus pais, Mauricio e Izanete pela oportunidade e pelos esforços e ao meu irmão Filiph;

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao PPGBV pelo acolhimento durante toda a graduação, iniciação científica e mestrado e aos professores do mesmo por tantos ensinamentos que levarei comigo;

À minha orientadora Profa. Diolina Moura Silva, pela orientação, incentivo e confiança durante todos esses anos;

À minha co-orientadora Profa. Valéria de Oliveira Fernandes, pelo incentivo, pelo carinho e por todos os ótimos momentos compartilhados;

À Profa. Maria do Carmo Pimentel Batitucci pela oportunidade, pelo carinho e pelo acolhimento em seu laboratório.

Ao pessoal do NGHM e agregados, principalmente à Júlia Marsiglia, pelo duradouro convívio e por todo ensinamento e risadas, me acolhendo com tanto carinho;

Aos alunos e professores do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, UFPel: principalmente Josi, Miriane, Prof. César Valmor Rombaldi e Prof. Jorge Adolfo Silva pelo acolhimento, pela disponibilidade e pelos ensinamentos durante o treinamento para realização de parte deste trabalho.

Às SEMPRE companheiras de batalha, Mariela Mattos e Sigrid Valbão pelos inúmeros momentos que fizeram fortalecer nossos laços de amizade, cumplicidade, auxílio e pelas boas risadas durante todo o período de laboratório. Vocês foram demais!

Aos amigos: Gabriela Zamperlini, Priscilla Nobres, Joilton Tavares, Vinícius Novo, Julia Martins, Mônica Regina e Stéfano Zorzal pelos grandes momentos de ajuda e inúmeros cafés: será uma saudade enorme!

Aos colegas da Botânica, pelos incontáveis finais de semana compartilhados dentro do laboratório e pelo carinho;

À mais animada turma de mestrado que alguém poderia ter: Ana Paula, Bruna, Elias, Gabriela, Kamila, Mariela, Poliana, Sigrid e Tarsila;

À Renata e Camilla, por tudo aquilo que me ensinaram durante todos esses anos;

À minha turma de graduação, pelos grandes amigos que fiz, pela saudade fortalecedora que sinto e por tudo o que eu aprendi. Muito obrigada, vocês foram tudo!

Ao secretário do PPGBV, Ricardo, por todo o auxílio durante minha permanência no Programa;

À Beth pelo carinho “1000 graus”;

Aos tantos amigos do apoio moral, por não me deixarem esquecer que existe vida além do mestrado!

Ao meu grande amigo não humano, Cirilo, que nos deixou neste período e à sua cria, Endy, que agora supre com muita alegria parte dessa perda!

Ao Sr. Nildo, Sra. Lourdes e ao Paulo pelas incontáveis caronas noturnas até a Universidade durante o período de coleta dos frutos;

Aos motoristas Gava e Lindário pelo transporte mensal “com ou sem emoção” até o campo;

Ao Sr. Paulo Sagrillo pela concessão dos frutos e pela confiança;

Ao Banco do Nordeste pelo financiamento do projeto;

Ao CNPq pela concessão das bolsas de estudo;

À Fundação Ceciliano Abel de Almeida-FCAA, em nome da gerente financeira, Kátia Domingas e do diretor geral Sr. Sebastião Pimentel Franco pela presteza na liberação dos recursos de execução do projeto;

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram e torceram para a realização deste trabalho;

Obrigada!

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade e a expressão gênica da pectinametilesterase, enzima relacionada às modificações da parede celular, e por consequência as alterações na qualidade dos frutos do mamoeiro (*Carica papaya* L.) cv. Golden durante o período pós-colheita, mantidos em condições naturais. Os frutos foram colhidos no estágio 2, higienizados e sanificados. Foram analisados durante 8 dias após a colheita (DAC) quanto às modificações no padrão de atividade das enzimas pectinametilesterase (PME) e poligalacturonase (PG), as características físicas como a firmeza e a expressão gênica da pectinametilesterase. Com o avanço dos dias de amadurecimento, a firmeza e a atividade enzimática foram avaliados quanto à sua inter-relação com os atributos qualitativos e observou-se que estes se relacionam diretamente com algumas características pré e pós-colheita. Os resultados obtidos comprovam a relação direta entre a atividade da pectinametilesterase com a perda de firmeza da polpa. A atividade da PME e da PG têm ação sinérgica, sendo fundamentais para o adequado funcionamento dos mecanismos responsáveis por algumas das mudanças físicas ocorridas na polpa dos frutos. As análises da expressão gênica e da atividade da pectinametilesterase mostraram uma resposta antagônica durante a pós-colheita. O aumento da expressão da PME com o passar dos dias respondeu contrariamente à atividade da enzima que decresceu no mesmo período. Essa resposta sugere a rápida transcrição e utilização dos oligonucleotídeos para a transformação em proteínas ativas no processo de amadurecimento dos frutos.

Palavras-chave: pectinametilesterase, poligalacturonase, pós-colheita, amadurecimento.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the activity and the genic expression of the pectinmethylesterase, enzyme related to the modifications of the cellular wall, and for consequence the alterations in the quality of the fruits of the papaya tree (*Carica papaya* L.) cv. Golden during the whole period post-harvest, maintained in natural conditions. The fruits were picked at the development stage 2 going by sanitization and higienization. They were analyzed for 8 days after the crop (DAC) as for the modifications in the pattern of activity of the pectinmethylesterase and polygalacturonase enzymes, physical characteristics of the fruits as the firmness, besides the genic expression of the pectinmethylesterase in the fruits. The progress of the days of ripening, the firmness and the enzymatic activity were appraised as for its interrelation with the qualitative attributes of the fruits and it was observed these links directly with some characteristics. The obtained results prove the direct relationship of the activity of the pectinmethylesterase (PME) with the loss of firmness of the pulp. The activity of PME and of the polygalacturonase (PG) have synergistic action, being fundamental for the good operation of the responsible mechanisms for some of the physical changes happened in the pulp of the fruits. The analysis of the genic expression and of the activity of the pectinmethylesterase showed an antagonistic answer during the post-harvest. The increase of the expression of PME with passing of the days answered contrary to the activity of the enzyme that declined in the same period. That answer suggests the fast transcription and use of the oligonucleotides for the transformation in active proteins in the process of ripening of the fruits.

Key-words: pectinmethylesterase, polygalacturonase, post-harvest, ripening.

LISTA DE ABREVIACOES

Abs – Absorbancia

DEPC – Dietil pirocarbonato

DNA – cido desoxoribonucleico

DNase – Desoxirribonuclease

dNTP – *Kit* de nucleotdeos (dTTP, dATP, dGTP, dCTP)

DTT – Ditioneitol

EDTA – cido etileno diamino tetra actico

g – Fora gravitacional

mg – Miligrama

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM - Milimolar

NaCl – Cloreto de sódio

nm – Nanmetro

C – Graus Celsius

OligoDT – Oligonucleotídeo T (dTTP)

pb- pares de bases

PG- poligalacturonase

PME- pectinametilsterase

PVP – Polivinilpirrolidona

RNA – cido ribonucleico

RNA_m – RNA mensageiro

RNA_r – RNA ribossomal

RNase – Ribonuclease

RT – Transcriptase reversa

TrisHCL – Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride

μg – Micrograma

μL – Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 METODOLOGIA	16
2.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE AMOSTRAGEM	16
2.1.1 Análise Física	16
2.1.2 Análises Bioquímicas	17
2.1.3 Análises Moleculares	19
2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
3.1 Relação entre a expressão gênica e atividade de enzimas pectinolíticas na firmeza da polpa do mamão Golden	26
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
5 REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

O consumo de frutas frescas tem se tornado um hábito cada vez mais freqüente na população. A alta perecibilidade de alguns frutos é o principal problema enfrentado pelos produtores na comercialização “in natura”, tanto no mercado nacional quanto internacional.

Para os frutos, a colheita é realizada a partir do momento em que os requisitos mínimos de qualidade são alcançados e para isto algumas características são analisadas, como teor de sólidos solúveis, firmeza de polpa, cor e aspecto da casca (ALVES et al., 2000).

Após a colheita, o amadurecimento é a fase mais estudada, justamente por ser nessa fase que as mudanças na composição dos frutos ocorrem com mais intensidade. De acordo com Watada et al. (1984), o amadurecimento é a fase que ocorre no fim do desenvolvimento e início da senescência, composta por inúmeros processos que determinam as características de qualidade, evidenciadas por mudanças na composição, coloração, textura e outros atributos sensoriais. Ao mesmo tempo em que o amadurecimento é responsável por tornar o fruto apropriado para o consumo, concomitante a ele, as perdas pós-colheita começam a se sobressair levando à redução na conservação.

Uma vez que o mamoeiro (*Carica papaya* L.) cv. Golden produz frutos de tamanho menor que o de outras cultivares e é ideal para o consumo “in natura”, o estudo do comportamento pós-colheita dos mesmos em condições naturais de armazenamento, sem tratamentos que possam influenciar ainda mais sua fisiologia são de grande relevância. A escolha pela ausência de tratamentos nas análises pós-colheita reduz o caráter modificante que pode alterar a resposta dos frutos.

Pelo fato de tratar-se de uma planta com produção durante todo o ano e seus frutos serem classificados como climatéricos, é importante, tanto em termos econômicos quanto nutricionais conhecer a inter-relação entre os diversos fatores que atuam sobre as alterações pós-colheita para que sejam preservados, o máximo possível, seus componentes naturais.

Para isso, tornam-se valiosos os estudos com objetivo de conhecer melhor as características pós-colheita dos frutos e o grau de associação entre elas com base nas transformações físicas, químicas e bioquímicas durante a maturação.

A modificação da estrutura da parede celular mediada por enzimas durante o amadurecimento tem sido estudada em diversos frutos. Estudos realizados em frutos climatéricos têm mostrado que as modificações nos polímeros da parede celular são uma consequência da ação coordenada de enzimas modificadoras de parede, como a pectinametilesterase, a poligalacturonase, pectato liase, β -galactosidase, α -L-arabinofuranosidase, endo-(1,4)- β -d-glucanase, β -xiloxidase, expansina, xiloglucano endotransglucosilase e endo-mananase (BRUMMELL; HARPSTER, 2001).

A ação da pectinametilesterase (PME – EC 3.1.1.11) sobre os componentes da parede celular pode produzir dois efeitos distintos. Um deles é a contribuição para o enrijecimento da parede por produzir ‘blocos’ de grupo carboxil monoesterificados que podem interagir com íons cálcio formando um gel de pectato. O outro efeito é a liberação de prótons que estimularão a atividade de hidrolases da parede celular, promovendo o afrouxamento da mesma (NARI et al., 1986; MOUSTACAS et al. 1991). A função mais comum da PME é a de atuar desmetilando a cadeia pectica e desencadeando o processo de amaciamento da polpa (XISTO et al., 2004). Já sua função como molécula de adesão dá-se principalmente na fase de crescimento e estruturação da parede celular (BRANDÃO; ANDRADE, 1999).

A regulação da atividade da PME é obtida em parte por expressão diferencial de suas isoformas e em parte pelo controle dos mecanismos pós-traducionais. Sabe-se que a PME é regulada pela concentração de H^+ de forma cíclica durante o crescimento da célula (RICARD; NOAT, 1986).

A atividade ótima da enzima ocorre em pH próximo da neutralidade e é reduzida quando ocorre diminuição do pH local, gerada por prótons liberados como resultado da reação da própria enzima. Essa diminuição do pH ativa glicosidases e glicosiltransferases que estão envolvidas com a extensão da parede celular. Essa extensão promove uma diluição das cargas negativas locais resultando num aumento do pH e reativando a PME, que dará início a novos ciclos de atividade (GIOVANE et al. 2004).

A poligalacturonase (endo-PG, EC 3.2.1.15 e exo-PG, EC 3.2.1.67) é a enzima responsável pelas alterações texturais mais avançadas que ocorrem com o amadurecimento. Ela atua quebrando ligações glicosídicas das substâncias pécticas para formar finalmente o ácido galacturônico. Quando encontrada em altos níveis, observa-se uma elevada solubilização das substâncias pécticas e consequente aumento do amolecimento da polpa (AHRENS; HUBER, 1990). A PG tem sua atividade relacionada à atividade da PME, uma vez que é dependente do produto da reação desta última. Seus níveis variam com os genótipos e estádios de amadurecimento (SANTOS JUNIOR et al. 2003).

Geneticamente, a presença do RNA mensageiro (RNAm) transcrito, código de uma isoforma enzimática, pode não estar diretamente correlacionada a atividade enzimática resultante, devido a diferentes taxas de transcrição entre as isoformas. Além disso, os RNAm das enzimas de degradação da parede celular em frutos de mamoeiro são produzidos somente em um curto período e específico estágio de amadurecimento do fruto (PAULL; CHEN, 1983). Por essa razão, ensaios para monitorar as mudanças na atividade enzimática durante o desenvolvimento e amadurecimento dos frutos são necessários para complementar o estudo da expressão genética dessas enzimas (GOULAO et al., 2007).

Mudanças nos teores de pectinas parecem estar sincronizadas não só às taxas de despolimerização e solubilização, mas também a outros eventos de transformação endógena, como a acidez, o teor de carboidratos, além de transformações sensoriais, como o sabor e a textura. Essa afirmativa tem suporte no fato de que o intervalo entre a antese e o amadurecimento, em condições climáticas similares, é relativamente constante para um determinado fruto (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Entretanto, o amadurecimento não é um estado fisiológico fixo, pois pode variar de um fruto para outro e, em alguns casos, as mudanças podem ocorrer até em direções opostas. Da mesma forma, a atividade de uma determinada enzima pode responder de forma distinta nos mais diferentes grupos de frutos, no entanto, a sequência ou a concomitância entre a atividade das enzimas deve ser coordenada para que as mesmas disponham de substrato suficiente para sua reação.

De forma conjunta, o estudo da transcrição de genes de enzimas da parede celular, bem como de sua expressão e atividade, durante a fase de amadurecimento dos

frutos requer ainda maiores esclarecimentos sobre o sincronismo e a influência de fatores externos que possam alterar a resposta geral de expressão e ativação dessas enzimas.

Com base nesses pressupostos, o objetivo do presente estudo foi caracterizar a relação entre a expressão e a atividade da enzima pectinametilesterase em mamões Golden, bem como sua relação com modificações físicas e bioquímicas na pós-colheita.

2 METODOLOGIA

2.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE AMOSTRAGEM

Frutos do mamoeiro (*Carica papaya* L.) cv. 'Golden' foram colhidos em uma lavoura comercial, localizada em Patrimônio do Farias, Linhares, na região Norte do Espírito Santo, latitude 19°49'13 sul, longitude 40°16'24 oeste e altitude de 60 metros (IBGE, 2005). O clima da região apresenta temperaturas máximas de 32 ± 2 °C, temperaturas mínimas de 12 ± 3 °C, e pluviosidade anual média de 1.041,4 mm (SILVA; NÓBREGA; RAMOS, 2008). Os frutos foram colhidos entre os meses de maio/08 a setembro/08, no estágio dois de amadurecimento, no qual apresentam de 16 a 25% da casca amarela (RITZINGER; SOUZA, 2000; OLIVEIRA et al., 2002), embalados separadamente e acondicionados em caixas de papelão, sendo imediatamente levados para o Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, localizado no campus da Universidade Federal do Espírito Santo/UFES em Vitória, ES.

No laboratório, procedeu-se a sanitização, higienização e semi-esterilização dos frutos. Os frutos foram lavados em água corrente, imersos em solução de hipoclorito de sódio 5% durante 5 minutos, secos ao ar livre e em seguida mantidos a uma temperatura de 22 ± 2 °C até o momento das análises.

As análises físicas e bioquímicas foram realizadas entre os meses de maio/08 a setembro/08, do 1° ao 8° dias após a colheita (DAC), sendo o 1° e o 8 °DAC tomados como controles do início e do final do amadurecimento pós-colheita, respectivamente. O completo amadurecimento foi definido como sendo aquele em que os frutos apresentavam a casca totalmente amarela e firmeza da polpa com valor mínimo de $0,498 \text{ Kgf cm}^{-2}$, mínimo detectável pelo equipamento usado nesta medição. As repetições consistiram de 5 frutos por dia, totalizando 40 frutos analisados mensalmente.

2.1.1 Análise Física

A análise da perda de firmeza dos frutos foi realizada com o auxílio de um penetrômetro manual (Geo-Met, FT-327) com ponteira de 8 mm. Em cada fruto

foram realizadas medições no mesocarpo da região equatorial. Foram feitas 6 medições em cada fruto, obtendo-se uma média expressa em Kgf cm⁻².

2.1.2 Análises Bioquímicas

A determinação da atividade da pectinametilesterase (PME – EC 3.1.1.11) foi realizada segundo o método espectrofotométrico descrito por Hagerman e Austin (1986) e modificado por Fontes et al. (2008). Esse método baseia-se na troca de cor do indicador de pH durante a realização de catálise pela PME. À medida que as ligações ésteres da pectina são hidrolisadas, grupos ácidos são produzidos provocando uma redução no pH e, como consequência ocorre uma alteração na cor do indicador.

O extrato enzimático foi preparado a partir de 5 g de polpa que foram homogeneizadas com um liquidificador manual (NKS, Brasil), durante 1 minuto em 40 mL de NaCl 1 M pH 7,5 contendo polivinilpirrolidona (PVP) 1%. Logo após, o homogenato foi centrifugado a uma temperatura de 4 °C durante 30 minutos a uma velocidade de 15000 x g em uma centrífuga refrigerada (Sigma 2k15, Alemanha). Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado em novos microtubos e armazenado em freezer à -22 °C até o momento do uso.

A atividade da pectinametilesterase foi determinada a partir de uma solução contendo uma mistura na proporção 1:0,075 de pectina cítrica 0,5% (p/v) em água destilada a 80 °C e azul de bromotimol (0,01% p/v) preparado em tampão fosfato de potássio 3 mM pH 7,5. O pH de todas as soluções e também o do extrato enzimático foram ajustados para 7,5 com NaOH 0,1 M.

Na cubeta, 2 mL da mistura foi adicionada à 550 µL de NaCl 1 M contendo polivinilpirrolidona (PVP) 1%. Imediatamente após, adicionou-se 250 µL do extrato enzimático sendo rapidamente homogeneizado dentro da cubeta. Procedeu-se então a leitura em espectrofotômetro (FEMTO, 700 Plus, SP, Brasil) da variação da absorbância a 620 nm em intervalos de 5 segundos durante 3 minutos para o monitoramento da mudança de cor do indicador. A cinética da atividade foi registrada com auxílio do programa FenWin 670 (2007). A diferença entre a

absorbância final e inicial, decorrente da adição da amostra, foi utilizada para o cálculo da atividade da pectinametilesterase, baseando-se em uma curva padrão de ácido galacturônico. Uma unidade da atividade da PME foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido galacturônico por miligrama de proteína por minuto.

A atividade da poligalacturonase (PG – EC 3.2.1.15) foi determinada segundo metodologia descrita por Collmer et al. (1988) com modificações, e os grupos redutores foram mensurados segundo metodologia descrita por Nelson (1944) e Somogy (1952).

Uma amostra de 20 g do mesocarpo foi triturada em 40 mL de álcool etílico durante 1 minuto com o auxílio de um homogeneizador manual (NKS, Brasil). Uma alíquota de 10 mL do homogenato foi retirada e separada em microtubos, que foram então centrifugados (Sigma, 2k15, Alemanha) a uma temperatura de 4 °C durante 30 minutos a 15000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 6,25 mL de álcool etílico 80% (v/v) e novamente centrifugado a 4 °C por 30 minutos a 15000 x g. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado foi então ressuspenso em 2 mL de tampão acetato de sódio 25 mM pH 5,0.

Procedeu-se incubação durante 30 minutos a 4 °C e as amostras foram novamente centrifugadas a 4 °C por 30 minutos a 15000 x g. O sobrenadante foi então coletado e armazenado em novos microtubos que foram mantidos a -22 °C até o momento das análises.

Para a dosagem, 400 μL de tampão acetato de sódio 25 mM pH 5,0 contendo NaCl 1,2 M foram misturados a 2,5 mL de solução de substrato pH 5,3. O substrato foi composto por ácido poligalacturônico 0,24% (p/v) em tampão acetato de sódio 75 mM, pH 5,3, EDTA 7,4 mM e NaCl 0,12 M. Esta mistura foi pré-incubada à 37 °C durante 10 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 100 μL do extrato enzimático. A mistura foi então incubada a 37 °C durante 30 minutos da qual foi retirada uma alíquota de 100 μL que foi adicionada à uma mistura composta por 750 μL de reagente de cobre⁽¹⁾ e 650 μL de tampão acetato de sódio 75 mM, pH 5,3. Procedeu-se imediatamente a incubação a 100 °C durante 10 minutos para que se

paralisasse a reação. Passado esse tempo, a mistura foi resfriada e 1,5 mL de reagente arsenomolibdato⁽²⁾ foi adicionado. Após 20 minutos, a absorbância foi determinada a 500 nm. A atividade poligalacturonásica foi expressa em μmol de ácido galacturônico mg proteína⁻¹ min^{-1} (micromol de ácido galacturônico por miligrama de proteína por minuto) com base em uma curva padrão composta por ácido D-galacturônico.

⁽¹⁾ Reagente de Cobre: O reagente foi preparado a partir de 250 mL de uma solução aquosa contendo tartarato de sódio 4,8% (p/v) e carbonato de sódio anidro 9,6% (p/v). Foram acrescentados a esta solução 100 mL de solução sulfato de cobre 4% (p/v), 16 g de bicarbonato de sódio e 500 mL de solução de sulfato de sódio 36% (p/v). O volume final foi ajustado para 1000 mL e o precipitado formado foi removido por filtração.

⁽²⁾ Reagente arsenomolibdato: O reagente foi preparado a partir de uma solução de 450 mL de molibdato de amônio 5,6% (p/v), 21 mL de ácido sulfúrico 96% e 25 mL de solução de arseniato ácido de sódio heptahidratado 12% (p/v). A mistura foi incubada por 24 h a 37 °C e armazenada em frasco âmbar.

O teor protéico foi determinado segundo o método descrito por Bradford (1976), a partir dos mesmos extratos de citosol e de parede celular utilizados para determinação das atividades enzimáticas, tendo a albumina sérica bovina como padrão. A determinação foi realizada pela adição de 2,5 mL do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 a 0,05 mL da amostra e 10 minutos após a adição do reagente realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

2.1.3 Análises Moleculares

A variável estudada foi a expressão transcricional correspondente à enzima pectinametilesterase (PME) pela técnica RT-PCR.

Extração do RNA

O RNA total foi extraído de 100 mg de polpa de mamão triturada em Nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bem fino com o auxílio de gral e pistilo. Posteriormente foi adicionado à amostra, em microtubo estéril, 500 μL do reagente

Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen®) sendo então brevemente ressuspendido em agitador do tipo Vórtex até completa ressuspensão da amostra, seguindo a metodologia descrita pelo fabricante.

A amostra foi mantida durante 5 minutos em temperatura ambiente e logo após foi centrifugada durante 2 minutos a 12000 x g em temperatura ambiente em centrífuga de mesa (Labnet, C1200/DW41). Da centrifugação coletou-se cuidadosamente o sobrenadante em um novo microtubo estéril de 1,5 mL e foi acrescentado 100 µL de NaCl 5 M para a clarificação do extrato. A amostra foi misturada em agitador de microtubos e adicionou-se 300 µL de clorofórmio PA. O microtubo foi tampado e misturado minuciosamente por inversão. A amostra foi novamente centrifugada durante 10 minutos a 12000 x g em temperatura de 4 °C em centrífuga refrigerada (SIGMA 2k15, Alemanha) para a separação de fases.

A fase aquosa foi recolhida, transferida para outro microtubo estéril e a este foi acrescentado igual volume de álcool 2-isopropanol (aproximadamente 400 µL). A nova mistura foi mantida por 10 minutos à temperatura ambiente e logo após centrifugada durante 10 minutos a 12000 x g à 4 °C.

O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de álcool etílico 75%, sendo então centrifugado em temperatura ambiente a 12000 x g por um minuto. Novamente descartou-se o sobrenadante cuidadosamente, e coletou-se o líquido remanescente com o auxílio de uma micropipeta.

Ao precipitado final (RNA), após secagem em temperatura ambiente, foram adicionados 30µL de água ultra-pura livre de RNases DEPC (Dietil pirocarbonato) – (*RNase free water Treated whit DEPC - Invitrogen®*) para dissolver o RNA.

Para a quantificação das amostras de RNA fez-se a leitura em espectrofotômetro, por análise da absorbância a 260 nm utilizando como padrão: 1 unidade $A_{260} = 40 \mu\text{g}$ de RNA mL^{-1} .

Para o controle da qualidade e pureza do RNA extraído foi realizado o cálculo da razão A_{260}/A_{280} referentes aos picos de absorção de ácidos nucleicos. Também foi

avaliada a integridade das moléculas de RNA total em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador ultravioleta.

A referência utilizada foi o marcador de peso molecular 100pb DNA *Ladder* (*Invitrogen*[®]).

Somente amostras com razões A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,0 foram utilizadas, na síntese de cDNAs.

RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction)

A técnica *RT-PCR* consiste na conjugação das técnicas de síntese de cDNA (uso da enzima transcriptase reversa - RT) e de *PCR* (uso da enzima *Taq* DNA polimerase). Dentre as técnicas de caracterização e quantificação da transcrição gênica, a técnica de *RT-PCR* destaca-se pela alta sensibilidade, o que possibilita o estudo de genes com baixas taxas de expressão e a utilização de pequenas quantidades de amostra. Também se destaca pela praticidade, já que permite obter resultados com extrações de RNA total e executável em curto tempo, quando comparada com outras metodologias. A técnica dispensa o uso de sondas radioativas para a visualização dos resultados.

Síntese do cDNA

A primeira fita de DNA complementar (cDNA) foi obtida utilizando a enzima transcriptase reversa.

O cDNA foi sintetizado a partir de 2 μg do RNA total (tratado com DNase) usando poli T como primer e o Kit SuperScript™ First-Strand System for RT-PCR (*Invitrogen*[®]).

Uma mistura (“mix”) contendo a amostra de RNA (2 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$), 1 μL de tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 10x, 1 μL de DNase e 7,4 μL de água ultra pura foi incubada a 25 °C durante 15 minutos em termociclador (Applied Biosystems, GeneAmp 9700, U.S.). Logo após, foi acrescentado 1 μL de EDTA e novamente incubado, agora por 10 minutos a 65 °C. Procedeu-se a adição de 1 μL de oligoDT e 1 μL da mistura dos desoxiribonucleotídeos (dNTPs).

Após nova incubação do meio a 65 °C por 5 minutos, 4 µL de MgCl₂ 25 mM, 2 µL de tampão 10x para PCR, 2 µL de 0,1 M de DTT (Ditiotreitol) e 1 µL de *RNaseOUT* (*Ribonuclease Inhibitor Recombinant - Invitrogen*®) foram adicionados ao microtubo e incubados em termociclador a 42 °C durante 2 minutos. Então, 1 µL (50 unidades) de *SuperScript II RT*®, foi adicionado e nova incubação se procedeu a 42 °C por 1 hora. A reação foi finalizada a 70 °C durante 15 minutos, e tratada com RNase H.

A partir das extremidades da sequência de bases da PME de mamão submetidas ao GeneBank por Gouveia et al. (1996), foram sintetizados oligonucleotídeos para serem utilizados como primers:

senso - Forward (F): F 5'-ATGCGGCTGATGGGAAA-3'

anti-senso - Reverse (R): R 5'-TAACCCGCAATGCTGCA -3'

ORIGIN

```

1 gcagtgtgg caaaagatgg aacgggaaac ttcagacgg tgaaagaggc catggatgcg
61 gctgatggga aaaaaaggtt tggatttac gtgaaagcag gagttataa ggagaaaatt
121 cacagtaata aagacgggat tactttgatc ggagatggta aatattccac catcattgtc
181 ggtgatgata gtgttgctgg aggtccacc atgccaggct ctgcaactat tacaatgaca
241 ggggatggat tcatagcccg cgacattggg ttcagaaca cagcagggcc acaaggagag
301 caagcttag ctctaaacat agcttctgat cactctgttc tttacaggtg cagcattgcg
361 ggttaccagg atactctcta cgcacacgct ctccgtcaat tctacagaga atgcgacatc
421 tacggcaccg tcgatttcat ttcggaaac gccgccgagg tttccaaaa ctgctacttg
481 gttcttcgtc ttctcggaa aaaaggctac aacgttattc tagcaaacgg aagatccgac
541 ccgggacaga acacggggtt ctctgttcac aactgcagaa tcgtaccag ctccgaattt
601 tctccggtaa aacataaata cgaatcgtat cttggtaggc catggaaaa

```

//

Esquema 1- Posicionamento dos *primers* (vermelho) confeccionados para amplificação do gene da pectinametilesterase, a partir da sequência

parcial do cDNA da enzima do mamão apresentada por GOUVEIA et al. (1996).

PCR do cDNA (*Reação em Cadeia da Polimerase*)

Para a amplificação do fragmento a partir do cDNA as condições otimizadas para a PCR foram 36 ciclos, com temperaturas de: desnaturação inicial a 95 °C por 1 minuto e 30 segundos, desnaturação a 95 °C por 1 minuto e 10 segundos, anelamento a 53 °C por 1 minuto, extensão (35 ciclos) a 72 °C por 1 minuto e 45 segundos e extensão final a 72 °C por 5 minutos. As condições da reação de PCR estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição do meio de reação para PCR

Componentes	Volume (µL)
Tampão 10X PCR (<i>Invitrogen</i>®)	2,5
MgCl₂ (50mM) (<i>Invitrogen</i>®)	1,5
dNTP <i>mix</i> (10mM cada) (<i>Invitrogen</i>®)	1,0
<i>RNase free water Treated with DEPC</i> (<i>Invitrogen</i>®)	16,7
<i>Primer Forward</i>	1,0
<i>Primer Reverse</i>	1,0
Amostra cDNA	1,0
<i>Taq DNA Polymerase</i> (<i>Invitrogen</i>®)	0,3
Volume final	25,0

Os resultados das reações de amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídeo (0,01 µg/µl) em transiluminador ultravioleta e em gel de poliacrilamida 7%, utilizando-se um marcador de 100 pb, DNA *Ladder* (*Invitrogen*®) e tampão de carregamento (*BlueJuice-Invitrogen*®).

2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises físicas e bioquímicas, adotou-se um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições diárias. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, com comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de

probabilidade com utilização do programa Assistat 7.4 (2007). O grau de relação entre os dados foi calculado pelas análises de regressão e correlação (LAPPONI, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho possibilitaram a elaboração de um artigo científico.

Para o artigo, a formatação segue as normas de publicação exigidas pelo periódico Bragantia ISSN: 0006-8705 para o qual foi submetido.

**3.1 RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO GÊNICA E ATIVIDADE DE ENZIMAS
PECTINOLÍTICAS NA FIRMEZA DA POLPA DO MAMÃO GOLDEN**

SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO NA REVISTA: **Bragantia (Campinas)**, ISSN: **0006-8705 (impressa)/ 1678-4499 (on line)**.

AUTORES: Sabrina Garcia Broetto

Mariela Mattos da Silva

Diolina Moura Silva

RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO GÊNICA E ATIVIDADE DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS NA FIRMEZA DA POLPA DO MAMÃO GOLDEN

Broetto, S.G.; Silva, M.M.; Silva, D.M.

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, UFES/ Departamento de Ciências Biológicas. Av. Fernando Ferrari, 514, Goiabeiras, Vitória, ES, 29075-910. sabroetto@yahoo.com.br; biovegetal@terra.com.br.

RESUMO

O presente trabalho objetivou avaliar a atividade e a expressão gênica da pectinamerilesterase sobre a firmeza da polpa durante a pós-colheita. As medidas foram feitas com o auxílio de um penetrômetro e a atividade da PME foi delineada baseada em um método espectrofotométrico. Os mamões foram colhidos no estágio 2 e levados para o Laboratório de Ecofisiologia Vegetal onde foram lavados e armazenados em temperatura ambiente. Durante os 8 dias após a colheita, foram analisados 5 frutos por dia, totalizando 40 frutos mensalmente, sendo os frutos utilizados para a análise de expressão, avaliados no 3º, 4º, 5º e 8º dias após colheita (DAC). Os frutos apresentaram uma diminuição da firmeza ao longo dos dias analisados, sendo essa mudança mais pronunciada entre 3º e 4ºDAC. A atividade da pectinametilesterase diminuiu ao longo dos dias após a colheita enquanto o padrão de bandas observado para os frutos durante o 3º, 4º, 5º e 8º DAC indicaram que a expressão da enzima tende a aumentar com o decorrer do amadurecimento. Este comportamento pode sugerir que tanto a atividade quanto a concentração enzimática promovem uma diminuição do acúmulo de transcritos e que mesmo com o passar do amadurecimento, a síntese dos oligonucleotídeos para a PME ainda continua.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: *Carica papaya*, expressão gênica, firmeza da polpa

ABSTRACT

The present work aimed at to evaluate the activity and the expression of the pectinmethylesterase about the variation of the firmness of the pulp during the post-harvest. Were appraised the loss of firmness of the fruits with the aid of a penetrometer and the activity of PME was assayed based on the spectrophotometric procedure. The papayas were picked at the development stage 2, put in cardboard boxes and taken for the Laboratório de Ecofisiologia Vegetal where they were washed and stored in room temperature. During the 8 days after the crop, 5 fruits were analyzed a day, totaling 40 fruits monthly, being the fruits used for the expression analysis, appraised in the 3°, 4°, 5° and 8°DAH. The fruits presented a decrease of the firmness along the analyzed days, being more pronounced the change between 3° and 4°DAH. The activity of the pectinmethylesterase decreased along the days after the harvest while the pattern of bands observed for the fruits during the 3°, 4°, 5° and 8° DAH indicated that the expression of the enzyme tends to increase with elapsing of the ripening. This behavior can suggest that as much the enzymatic activity as the enzymatic concentration promotes a decrease of the accumulation of transcripts and that even with during ripening, the synthesis of the oligonucleotides for PME still continues.

INDEX TERMS: genic expression; firmness;

INTRODUÇÃO

A busca cada vez mais necessária pela integração entre as diferentes respostas relacionadas ao amadurecimento de frutos chama a atenção para a análise de diversas modificações decorrentes do amadurecimento pós-colheita.

Uma das características tipicamente associada à maturação dos frutos é o amolecimento da polpa. Durante a fase de amadurecimento, os principais eventos bioquímicos ocorridos na parede celular envolvem a perda de adesão celular e a degradação da lamela média. Em frutos, os polissacarídeos pécticos são o principal constituinte da lamela média e sua degradação é um evento importante e sempre acompanhado de aumento da solubilidade e despolimerização (Wakabayashi *et al.*, 2000).

Envolvidos na alteração da firmeza da polpa durante o amadurecimento estão os processos enzimáticos representados principalmente pela ação de enzimas modificadoras das paredes celulares, como a pectinametilesterase.

Entre estas enzimas podem-se mencionar as pectinolíticas incluindo aquelas que catalisam a remoção de resíduos esterificados ou metilados dos ácidos poligalacturônicos, a pectinametilesterase (PME), e as que promovem a quebra hidrolítica dos ácidos poligalacturônicos, as poligalacturonases (PG), em cadeias de polímeros de ácido galacturônico (Jayani *et al.*, 2005; Karakurt & Huber, 2003).

Enquanto Bicalho *et al.* (2000) sugeriram que a atividade da PME precede a atividade da PG, uma vez que a PME atua na desmetilação do poliuronídeo e a PG liga-se ao substrato linear desmetilado, após a atuação da PME, Manrique & Lajolo (2004) propuseram a participação da PME diretamente no processo de amolecimento dos frutos, desesterificando o polímero de ácido galacturônico (pectina), enquanto a PG catalisa a hidrólise das ligações beta-1,4 entre os resíduos de ácido galacturônico no interior da cadeia de pectina.

Junto à análise da atividade enzimática, estudos voltados para expressão gênica das enzimas têm-se mostrado de vital importância. Estudos com a intenção de desenvolver conhecimento e tecnologia para o prolongamento do tempo de prateleira e manutenção da qualidade dos produtos oferecidos ao mercado têm cada vez mais utilizado ferramentas da biologia molecular.

Devido ao evidente requerimento contínuo e uma meia-vida pequena das enzimas envolvidas com o amadurecimento, é conhecida uma pequena síntese protéica e de ácidos nucléicos nas primeiras etapas de maturação. Segundo Chitarra e Chitarra (2005), o climatério parece ser uma fase de reorganização metabólica baseada em mudanças no padrão da síntese protéica.

Nos frutos climatéricos como é o caso do mamão, o evento de síntese de etileno ocorre em razão do aumento na síntese e na atividade de enzimas específicas. Este etileno interage de forma a induzir o acúmulo de RNA mensageiro (RNAm). Segundo (Goulao et al., 2008) a presença do etileno estimula a produção de novos RNAm e enzimas da parede celular.

O objetivo deste trabalho foi avaliar relação entre a expressão gênica e a atividade de enzimas pectinolíticas com a redução na firmeza da polpa de frutos de mamão da cultivar Golden ao longo do amadurecimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Frutos do mamoeiro (*Carica papaya* L.) cv. 'Golden' foram colhidos em uma lavoura comercial, localizada em Patrimônio do Farias, Linhares, na região Norte do Espírito Santo. O clima da região é classificado como Awi na Escala de Koopen (tropical úmido), que se caracteriza por um verão úmido e um inverno seco (Rolim et al., 1999). Apresenta temperaturas máximas de 32 ± 2 °C, temperaturas mínimas de 12 ± 3 °C, e pluviosidade anual média de 1.041,4 mm (Silva; Nóbrega; Ramos, 2008). Os frutos foram colhidos entre os meses de maio/08 a setembro/08, no estágio dois de amadurecimento, no qual apresentam 16 a 25% da casca amarela (Ritzinger e Souza, 2000; Oliveira et al., 2002), embalados separadamente e armazenados em caixas de papelão, sendo imediatamente levados para o Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, localizado no campus da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES.

No laboratório, os frutos foram lavados em água corrente, mergulhados em solução de hipoclorito de sódio 5% (p/v) durante 5 minutos e mantidos a uma temperatura de 22 ± 2 °C até o momento das análises.

As análises foram realizadas do 1° ao 8° dias após a colheita (DAC), sendo o 1° e o 8° DAC tomados como controles do início e do final do amadurecimento pós-colheita, respectivamente. O completo amadurecimento foi definido como sendo aquele em que os frutos apresentavam a casca totalmente amarela e/ou firmeza da polpa com valor mínimo de $0,498 \text{ Kgf cm}^{-2}$, mínimo detectável pelo aparelho. As repetições consistiram de 5 frutos por dia, totalizando 40 frutos analisados mensalmente.

Análises Físicas

A análise da firmeza dos frutos foi realizada com o auxílio de um penetrômetro manual (Geo-Met, FT-327) com ponteira de 8 mm. Em cada fruto foram realizadas medições no mesocarpo da região equatorial. Foram feitas 6 medições em cada fruto, cuja média foi expressa em Kgf cm^{-2} .

Análises Bioquímicas

A determinação da atividade da PME foi realizada segundo o método espectrofotométrico descrito por Hagerman e Austin (1986) e modificado por Fontes et al. (2008).

A atividade da PG foi determinada segundo metodologia escrita por Collmer *et al.* (1988).

Tanto para a atividade da PME quanto da PG, uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de $1 \mu\text{mol}$ de ácido galacturônico $\text{mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (micromol de ácido galacturônico por miligrama de proteína por minuto) com base em uma curva padrão composta por ácido D-galacturônico.

Análise Molecular

O RNA total foi extraído de 100 mg de polpa de mamão triturada em Nitrogênio líquido com o auxílio de gral e pistilo. Posteriormente foi adicionado à amostra, 500 μL do reagente Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen®) sendo então totalmente ressuspensionado em agitador, seguindo a metodologia descrita pelo fabricante.

A amostra foi mantida durante 5 minutos em temperatura ambiente e centrifugada por 2 minutos a 12000 x g em temperatura ambiente em centrífuga de mesa (Labnet, C1200/DW41). O sobrenadante foi coletado em outro microtubo e foi acrescido de 100 μL de NaCl 5 M e 300 μL de clorofórmio PA, sendo então misturado por inversão.

Após nova centrifugação durante 10 minutos a 12000 x g e 4 °C em centrífuga refrigerada (SIGMA 2k15, Alemanha) para a separação de fases, a fase aquosa foi recolhida, foi acrescentado igual volume de álcool 2-isopropanol (aproximadamente 400 μL). A nova mistura foi mantida por 10 minutos à temperatura ambiente e logo após centrifugada durante 10 minutos a 12000 x g à 4 °C.

O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de álcool etílico 75%, sendo então centrifugado em temperatura ambiente a 12000 x g por um minuto. Descartou-se totalmente o sobrenadante.

Ao precipitado final (RNA), após secagem em temperatura ambiente, foram adicionados 30 μL de água ultra-pura livre de RNases DEPC– (RNase free water Treated whit DEPC - Invitrogen®) para dissolver o RNA.

Para a quantificação das amostras de RNA fez-se a leitura em espectrofotômetro a 260 nm utilizando como padrão: 1 unidade $A_{260} = 40 \mu\text{g}$ de RNA mL^{-1} .

Para o controle da qualidade e pureza do RNA extraído foi realizado o cálculo da razão A_{260}/A_{280} referentes aos picos de absorção de ácidos nucléicos e a visualização do RNA total em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A referência utilizada foi o marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Invitrogen®).

A reação de RT-PCR foi realizada utilizando-se amostras de RNAm extraídos dos frutos e oligonucleotídeos específicos para a PME, com auxílio do Kit comercial Super Script™ First-Strand System for RT-PCR (Invitrogen®), segundo protocolo do fabricante. Os oligonucleotídeos específicos para PME utilizados na reação de RT-PCR, foram definidos por meio do alinhamento de sequências de nucleotídeos das extremidades 5' e 3'. O produto de amplificação obtido da reação de RT-PCR foi identificado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 7% tendo como marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder Invitrogen®, todos acrescidos de tampão de carregamento.

Análise Estatística

O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado que consistiu de 8 dias após a colheita, sendo utilizados 5 frutos por dia, analisados em triplicata. Para a interpretação dos resultados realizou-se a análise de variância ANOVA, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Lapponi, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A firmeza é um dos atributos de maior importância para a análise do comportamento pós-colheita dos frutos no que se refere à integridade da parede celular e, por consequência na resistência da polpa dos frutos. Essa firmeza relaciona-se fortemente à qualidade do fruto e é uma característica bastante visada pelo consumidor no momento da escolha do fruto.

Alterações bruscas na perda de firmeza podem indicar modificações em diversos níveis do processo que resulta num maior ou menor amolecimento da polpa. Na Figura 1 observa-se o perfil da perda de firmeza da polpa dos frutos de mamoeiro cv. Golden.

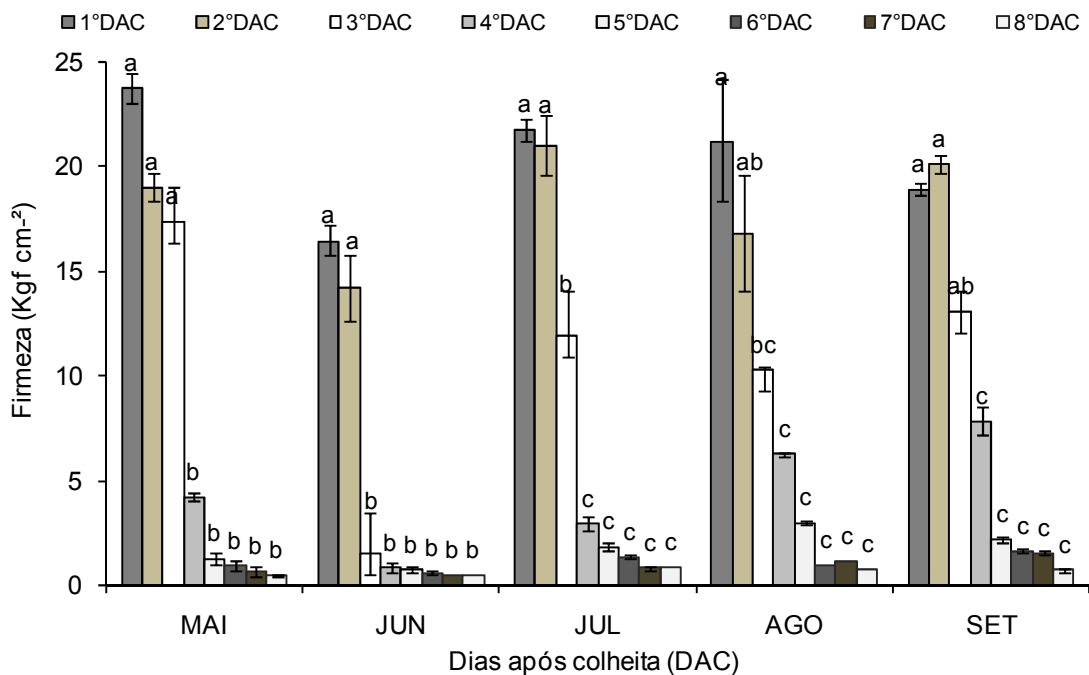


Figura 1- Firmeza da polpa dos frutos do mamoeiro cv. Golden avaliados durante 8 dias após a colheita (DAC) em frutos coletados entre maio/08 a setembro/08. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os DAC pelo teste de Tukey a 5%. Barras verticais indicam o erro padrão. (n=5)

É notório o decréscimo brusco da firmeza após o 2º DAC, mesmo tendo sido observada grande variação da firmeza nos diferentes meses analisados. Nota-se que nos frutos colhidos em junho (segunda medida) ocorreu uma queda de 14,20 Kg/cm² no 2º DAC para 1,54 Kg/cm² no 3º DAC.

O período que compreende o 3º e 4º DAC pode ser considerado o momento crítico do amolecimento da polpa, ocasionado pela dissolução da parede celular e pode estar relacionado ao período em que ocorre o máximo da respiração climatérica nestes frutos.

A partir do 4º DAC os frutos tiveram um padrão de amolecimento estatisticamente semelhante até o 8º DAC. Diferentemente, Fontes et al. (2008) trabalhando com frutos da cultivar Sunrise Solo observaram queda brusca da firmeza somente a partir do 4º DAC.

A manutenção da firmeza dos frutos é uma característica bastante apreciável no mamão principalmente nos frutos da cultivar 'Golden', uma vez que são os mais consumidos tanto

pelo mercado interno quanto externo de frutos de mesa. Frutos mais firmes tornam-se mais atraentes e resistentes ao transporte por tempo maior. Em frutos submetidos à temperatura, condições de armazenamento naturais e ausentes de tratamentos que reduzam as perdas nos frutos, é importante também para se conhecer o padrão e o comportamento normal dos mesmos. Esses estudos podem fornecer subsídios para o entendimento da fisiologia básica e livre de interferências.

Segundo Zhang e Paull (1990), somente após o amarelecimento de 80% da casca é que há significativa diminuição da firmeza de frutos de mamoeiro.

Wills e Widjanarko (1995) apontam que quedas mais acentuadas na firmeza de frutos de outras variedades de mamão ocorrem nos primeiros dias após a colheita, independente do estágio de maturação no momento. Isto pode ser explicado pelo fato da perda de firmeza ser mais pronunciada na primeira metade (entre 2° e 4°DAC) do período pós-colheita, para frutos “in natura” e mantidos em condições ambientais. Neste caso, frutos colhidos no estágio 1 ou 2 de amadurecimento não apresentam pico de amadurecimento tão diferenciado ou tão retardado que possa levá-los a amolecer drasticamente somente após o 5°DAC. Sendo assim, o fruto de mamoeiro é caracterizado por ter uma diminuição da firmeza nos primeiros dias após a colheita, fase crítica para as alterações metabólicas desse fruto.

Portanto, os dados obtidos para o mamoeiro ‘Golden’ neste trabalho indicam que os frutos apresentaram comportamento semelhante ao encontrado por outros autores (Paull e Chen, 1983) que afirmam ser nos primeiros dias após a colheita o período com maior velocidade de perda de firmeza. Os resultados observados na Figura 1 mostram que essa perda ocorreu durante os primeiros dias que se sucedem à colheita, representados pelo período compreendido entre o 2° e o 4° DAC.

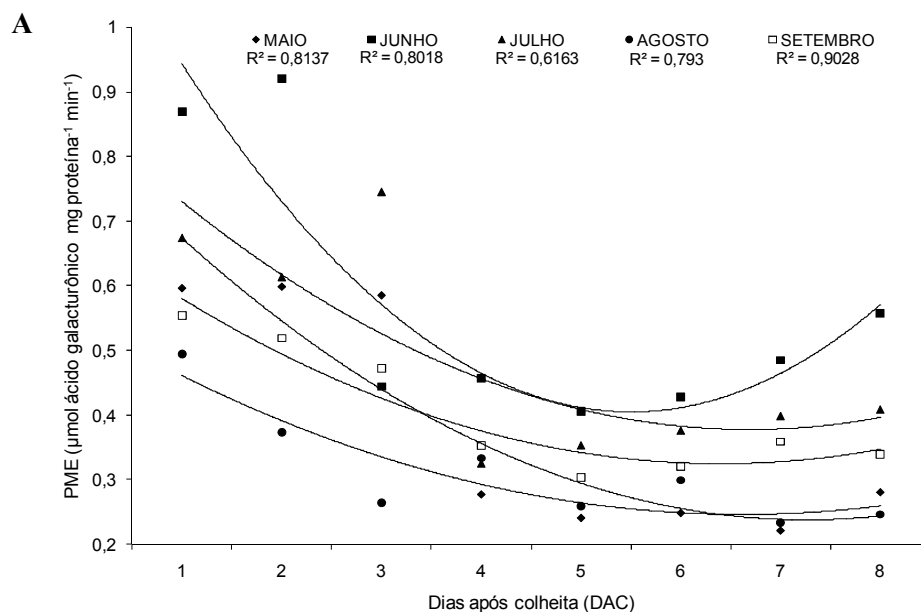
Associado à perda de firmeza da polpa, o conhecimento da expressão de genes envolvidos nas modificações da parede celular é crucial para a associação dos eventos que levam ao amaciamento da polpa.

A análise por RT-PCR utilizando primers específicos para a pectinametilsterase do mamão mostrou resultados diferenciados durante os dias de amadurecimento (Figura 3c).

Esta técnica destaca-se pela sensibilidade que permite o estudo de materiais gênicos com baixa taxa de expressão além de exigir uma pequena quantidade de amostra (Vieira, 2008).

Para um bom aproveitamento da técnica, faz-se necessária a utilização de RNAs de boa qualidade, livres de contaminações, de proteínas, DNA genômico e metabólitos secundários (Liu et al., 1998).

Para a escolha dos dias após a colheita que seriam utilizados para a expressão da PME, foram utilizados resultados da atividade da enzima para se determinarem as modificações mais pronunciadas durante os 8 DAC, de acordo com a Figura 3A. O RNA extraído de frutos de mamoeiro apresentou boa integridade de acordo com o representado pela Figura 2.



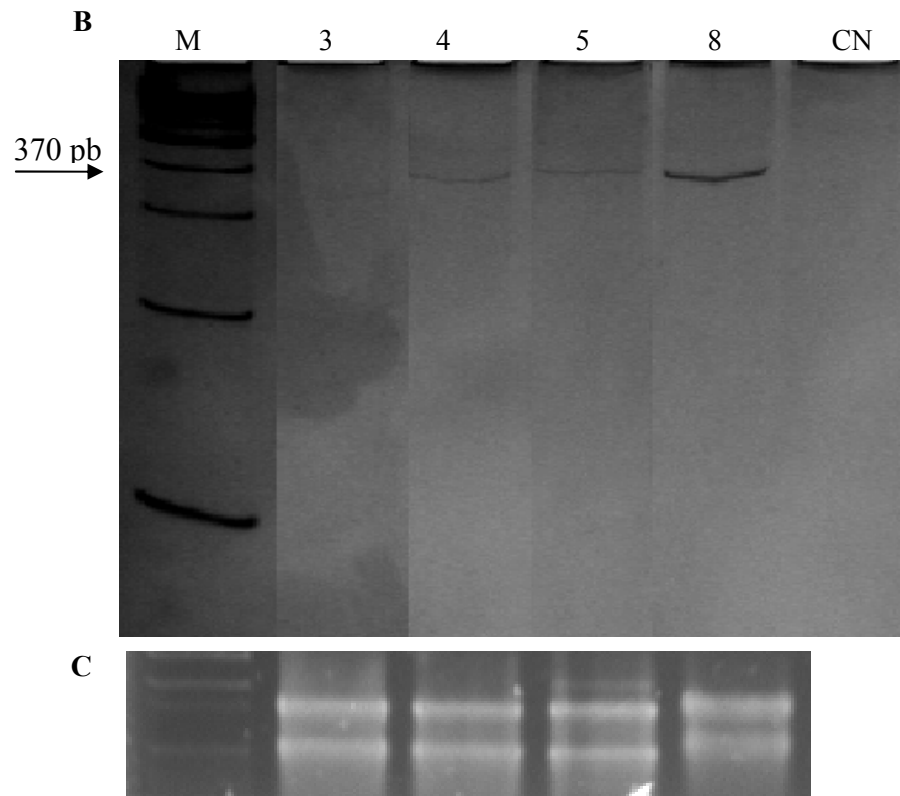


Figura 3- (A) Atividade da pectinametilesterase durante os dias após a colheita. Cada ponto representa a média de 5 frutos por dia em triplicatas. (n=5).

(B) Perfil da amplificação por RT-PCR para os oligonucleotídeos *pme1*, obtidos a partir de mRNAs aos 3, 4, 5 e 8 DAC do mês de julho. M - marcador de peso molecular *100pb DNA Ladder*. CN - controle negativo.

(C) RNAs obtidos de amostras de frutos durante a pós colheita: (3)= 3°DAC; (4)= 4°DAC; (5)= 5°DAC; (8)= 8°DAC; M = marcador de peso molecular.

A atividade da PME (Figura 3A) mostrou que a atividade da enzima logo nos primeiros dias após a colheita apresentou-se elevada no 1° e 2° DAC sem diferenças estatísticas. Já o 4° DAC foi o que apresentou diferença estatística mais acentuada para a atividade enzimática em relação aos primeiros dias. Observou-se que do 3° para o 4°DAC houve decréscimo na atividade da PME de 0,745 para 0,325 μmol ácido galacturônico mg proteína⁻¹ min⁻¹ e que esta manteve-se estatisticamente semelhante até o último dia das análises (8°DAC).

Observou-se que prevaleceu uma tendência estatística de queda na atividade específica da pectinametilesterase em todos os meses analisados no período compreendido entre o 1° e o

5°DAC. Nos primeiros dias após a colheita a atividade foi estatisticamente maior que aquela encontrada nos últimos dias avaliados. Destes, o perfil que mostra uma característica interessante é aquele exibido pelos frutos colhidos no mês de junho. Em consonância com a firmeza do fruto, a atividade da PME foi bastante elevada em relação aos outros meses nos dois primeiros dias após a colheita. Tais resultados indicam que a atividade da PME pode ter sido responsável pela queda da firmeza nos meses analisados confirmando os resultados obtidos por Fontes et al. (2008).

Também no mês de junho, observou-se ainda que na fase final do amadurecimento, entre 7° e 8°DAC a atividade da PME apresentou um ligeiro incremento. Aumento da atividade neste período da maturação do fruto pode indicar uma reativação ou síntese “de novo” em resposta à diminuição da quantidade de substrato para a enzima que atua despolimerizando a cadeia péctica – a poligalacturonase (PG) - e que atua consecutivamente à atividade da PME, requerendo o produto da atividade da PME para que possa ser ativada. Após a ação da PG, cadeias pécticas ainda não desmetiladas são expostas e podem sofrer, ainda que em menor quantidade, a ação da PME. Este evento pode ser o possível fator que levou ao incremento da atividade enzimática na fase final do amadurecimento.

Sabe-se que o amaciamento do mamão no amadurecimento envolve desorganização do tecido por meio da degradação da parede celular, em um processo, em geral, localizados na lamela média (D’Innocenzo, 2001). A desorganização do tecido e a aparente desestruturação das paredes apresentam correlação temporal com a atividade enzimática. As células no tecido do fruto verde ainda nos primeiros dias após a colheita apresentam-se muito mais organizadas e com a estrutura preservada no estágio em que a polpa apresenta maior firmeza. Neste trabalho esse momento coincidiu com o de maior atividade da PME. Ao contrário, as células da polpa amaciada apresentam estruturas irregulares e desorganizadas, momento em que a atividade da PME já começa a diminuir, assim como a firmeza da polpa.

A alta atividade da PME no início do amadurecimento deve-se também aos processos de divisão celular e o alongamento das células ainda observados nos primeiros dias após a colheita. Uma “nova síntese” massiva de pectinas altamente esterificadas durante a fase em que os frutos são predominantemente verdes ocorre porque nessa fase há um aumento do número de células do tecido e do volume celular (Draye e Cutsem, 2008).

A comparação entre a atividade da PME e a expressão da enzima (Figura 3B) durante os dias em que há maiores alterações em seu perfil mostra resultados antagônicos.

Dentre as enzimas envolvidas no processo de amadurecimento, a pectinametilesterase, mas também outras enzimas, apresentam um aumento de expressão do RNAm e como consequência um acentuado aumento na síntese protéica com o decorrer do amadurecimento (Villarreal et al., 2008).

Observa-se que todas as amostras apresentaram dois fragmentos de RNA visíveis quando aplicadas em gel (Figura 3C), confirmando o resultado expresso pela razão de absorbância (A_{260nm}/A_{280nm}) que esteve sempre entre o intervalo de 1,84 e 2,00. Podem ser observadas duas bandas discretas correspondentes aos RNAs ribossomais, 25S e 18S. Como 98 % a 99 % do RNA total correspondem ao RNA ribossomal (RNAr), a integridade de uma amostra de RNA pode ser determinada pela integridade do RNAr (Sambrook et al., 1989). Uma vez obtidos bons padrões de RNA, os perfis eletroforéticos das ampliações dos cDNAs, obtidos a partir de RNAs extraídos dos frutos, em presença dos oligonucleotídeos da PME apresentaram fragmentos 370pb, como esperado, e são mostrados na Figura 3B.

Ao contrário do perfil de atividade da PME, o padrão de bandas observado para os frutos durante o 3°, 4°, 5° e 8° DAC indicaram que a expressão da enzima tende a aumentar com o decorrer do amadurecimento. Através das análises por RT-PCR, observou-se que transcritos do gene da PME foram amplificados no 4°, 5° e 8°DAC, sendo que no 3° DAC não se observou amplificação. Este comportamento pode sugerir que tanto a atividade quanto a

concentração enzimática promovem uma diminuição do acúmulo de transcritos e que mesmo com o passar do amadurecimento, a síntese dos oligonucleotídeos para a PME é contínua.

Apesar da forte presença dos transcritos para a enzima no 8º DAC, os frutos já se apresentam na fase final de amadurecimento. Ainda assim, observa-se no gráfico de atividade da enzima que ainda há um relativo incremento da atividade, possivelmente gerado pelo acúmulo de transcritos codificantes da enzima.

Em virtude da grande demanda enzimática nos primeiros dias após a colheita, observado pela atividade da PME ao longo dos dias após a colheita (Figura 3A), uma possibilidade para o padrão inverso de expressão gênica da PME pode ser explicado pelo fato de que a transcrição pode ter ocorrido durante um curto período de tempo e o RNA pode não ter sido extraído durante o pico de transcrição da PME. Semelhante a esses resultados são aqueles apresentados por Goulao, Cosgrove e Oliveira (2008) que trabalharam com diferentes cultivares de maçã.

Outra possibilidade sugere que menor expressão da PME nos primeiros dias após a colheita, concomitante com a elevada atividade enzimática, esteja relacionada a uma rápida conversão dos transcritos em proteínas ativas, principalmente pela já conhecida meia-vida curta das enzimas pectinolíticas, indicando que o acúmulo de transcritos ao longo do amadurecimento seja em decorrência da pequena demanda de unidades da enzima atuando sobre a cadeia poligalacturônica.

A atividade das PMEs é detectada durante todas as fases do desenvolvimento dos frutos, sendo que picos de atividade são observados quando os frutos são ainda pequenos e imaturos e logo no início do processo de amadurecimento (HARRIMAN et al., 1991). No entanto, esses picos são alcançados após um declínio considerável na acumulação de RNAm para PME. Não se sabe quais fatores controlam a expressão do gene da PME no desenvolvimento do fruto (BRUMMELL e HARPSTER, 2001), pois, aparentemente, o etileno não participa deste processo (ALEXANDER e GRIERSON, 2002).

Os resultados obtidos representam relevante contribuição para o conhecimento do padrão de expressão da PME para frutos do mamoeiro ao longo da pós-colheita. A metodologia utilizada não foi citada para nenhum outro estudo de expressão gênica com frutos do mamoeiro Golden, podendo ser indicada como protocolo básico de análise de frutos submetidos não só a condições ambientes, mas também aqueles submetidos a diversos tratamentos que alterem o padrão de atividade enzimática na parede celular.

A atividade da PME deve preceder a atividade da PG uma vez que a primeira tem a função de desmetilar e preparar a cadeia poligalacturônica para a ação da PG despolimerizando-a (Antunes et al., 2006).

O perfil da atividade das enzimas responsáveis pelos eventos iniciais de desestruturação da parede celular está representado na Figura 4.

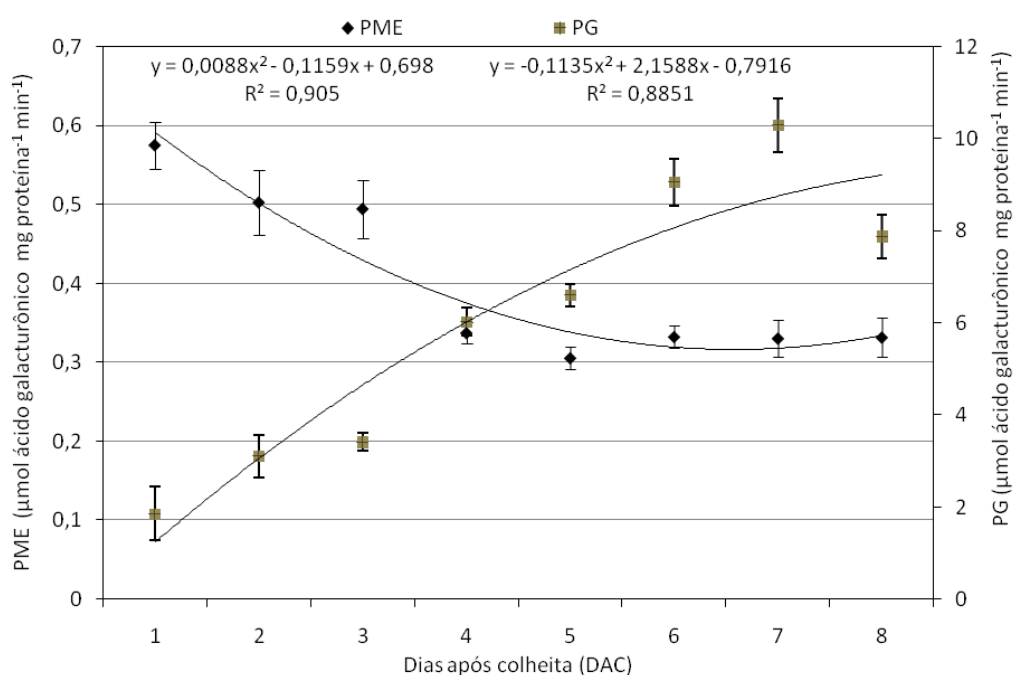


Figura 4- Atividade específica da pectinametilesterase (PME) e da poligalacturonase (PG) ao longo de oito dias após a colheita de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) cv. Golden. As barras verticais indicam o erro padrão da média. (n= 5).

Na Figura 4 observa-se que a atividade da pectinametilesterase diminuiu ao longo dos dias após a colheita enquanto a atividade da poligalacturonase aumentou no mesmo período.

Nota-se que a atividade da pectinametilesterase que já se encontrava elevada no 1ºDAC, apresentou uma diminuição no 2ºDAC e a partir do 4ºDAC a atividade permaneceu contante até que os frutos atingissem o 8ºDAC evidenciando que a PME teve seu pico de atividade nos primeiros dias após a colheita. Este comportamento confirma o que foi sugerido por Lima *et al.* (1996), de que a PME pode ter uma ação preparatória da protopectina, pela remoção dos grupamentos metil, preparação esta que resulta numa ativação da PG.

A PME decresceu drasticamente em frutos mantidos em temperatura ambiente provavelmente devido a fermentações ocorridas, provocadas pela instalação de fungos, reduzindo a atividade da PME provavelmente pela falta de substrato (ácido poligalacturônico).

Da mesma forma, Harriman *et al.* (1991) afirmaram que a atividade da PME de tomates é detectada durante todas as fases do desenvolvimento dos frutos, sendo que picos de atividade são observados quando os frutos são ainda pequenos e imaturos e logo no início do processo de amadurecimento, ou seja, sua atividade mais pronunciada ocorre nos primeiros dias que sucedem o amadurecimento. O mesmo perfil foi encontrado para os frutos deste trabalho.

Santos (2007), trabalhando com frutos imaturos de mamão da cv. Golden, também verificou que o aumento da atividade da PME ocorre ainda quando os frutos estão fisiologicamente imaturos e próximos à fase de colheita.

Quando analisados a partir da fase própria para comercialização, os frutos ainda apresentaram elevados valores de atividade da PME, demonstrando que há uma grande variação no perfil de atividade desta enzima, já que muitos trabalhos relacionados a outros frutos apresentam perfil da atividade totalmente inversos. Faz-se necessário o estudo detalhado do comportamento enzimático em outros frutos para uma caracterização espécie-específica frente à enorme diferenciação entre eles.

Fayyaz *et al.* (1995) encontraram em seu trabalho com mamões da cv. Eksotica que o ácido galacturônico age como inibidor da atividade da PME, o que pode também ser um fator determinante na inibição desta enzima nos frutos aqui analisados.

Observa-se que a atividade da PG apresentou um incremento inicial desde o 1ºDAC, aumentando significativamente ao longo dos dias, sendo o 7ºDAC aquele que apresentou a maior atividade enzimática. A menor atividade da PG nos primeiros dias após a colheita pode ser explicado pela quantidade inicialmente pequena de substrato disponível para as reações de despolimerização da cadeia péctica (Abeles & Takeda, 1989; Resende *et al.*, 2004). A elevação dos níveis de cadeias pécticas disponíveis à ação da PG é gradualmente gerada com o passar dos dias, por atividade da PME. Uma maior oferta de substratos para a ação da PG promove um aumento de sua atividade.

Já no 8º DAC a atividade da PG caiu de 10,28 para 7,87 μmol ácido galacturônico mg proteína⁻¹ min⁻¹. O decréscimo apresentado no final do amadurecimento pode ser explicado exatamente pelo fato dos frutos já se apresentarem na fase de senescência apresentando-se com polpa amolecida suficientemente para que cessem os eventos de desestruturação da parede celular, sobressaindo agora os eventos de degradação sobre a polpa dos frutos, como por exemplo, o processo fermentativo, mais acentuado nesse período (Antunes *et al.*, 2006)

Comportamento semelhante foi observado em relação à atividade da PG, que aumentava somente quando a atividade da PME começava a decair. Antunes *et al.* (2006), trabalhando com amoreira-preta, observaram um aumento linear da atividade da PME durante todo o período de conservação e redução de PG a partir do terceiro dia de armazenamento em temperatura ambiente, contrariando dados relativos ao comportamento destas enzimas em frutos de outras espécies.

A atividade da PME é importante no amolecimento dos frutos durante o amadurecimento e afeta substancialmente a integridade dos tecidos durante a senescência e a transformação

característica dos frutos (Brummell & Harpster, 2001), funcionando dessa forma como enzima iniciadora e sinalizadora para os eventos que efetivamente levam à desestruturação da parede celular.

Pimenta; Vilela & Carvalho Júnior (2004) descrevem também que a pectinametilesterase tem uma atividade ótima a pH 7,5, e para desesterificar uma unidade esterificada requer, pelo menos, uma unidade de ácido galacturônico livre do grupo metílico. A atuação da pectinametilesterase desmetilando as pectinas faz-se necessária, uma vez que a poligalacturonase torna-se inativa na presença de grupos metílicos.

Segundo Bicalho (1998), a atividade de PME deve preceder a atividade da PG, no sentido de facilitar a atividade desta última, pela desmetilação da pectina. A PG teria maior afinidade pelo substrato linear após a atuação da PME, o que para os mamões do presente trabalho foi observado. Estes resultados sugerem que há maior atividade da PME, com maior solubilização de pectinas, e por consequência alteração na firmeza dos frutos.

Uma vez que a perda de firmeza da polpa é o evento visível característico da ação de enzimas degradativas, sua correlação com a atividade destas indica o grau de associação das modificações físicas com as alterações bioquímicas da polpa dos frutos.

Com o intuito de analisar-se o grau de dependência entre estes parâmetros, a correlação entre a atividade da PME e da PG e a firmeza da polpa dos mamões está representada na Figura 5.

Ao se analisar a correlação entre a firmeza da polpa e a atividade da PME nota-se que ambas tiveram uma correlação positiva e diretamente proporcional ($r= 0,9564$), ou seja, quando a polpa apresentava alta atividade da PME, a firmeza ainda era elevada e quando a atividade apresentava menores valores a firmeza da polpa já se encontrava diminuída, o que leva a sugerir que há outros fatores, como a atividade de outras enzimas que podem alterar de forma mais efetiva e direta na perda de firmeza.

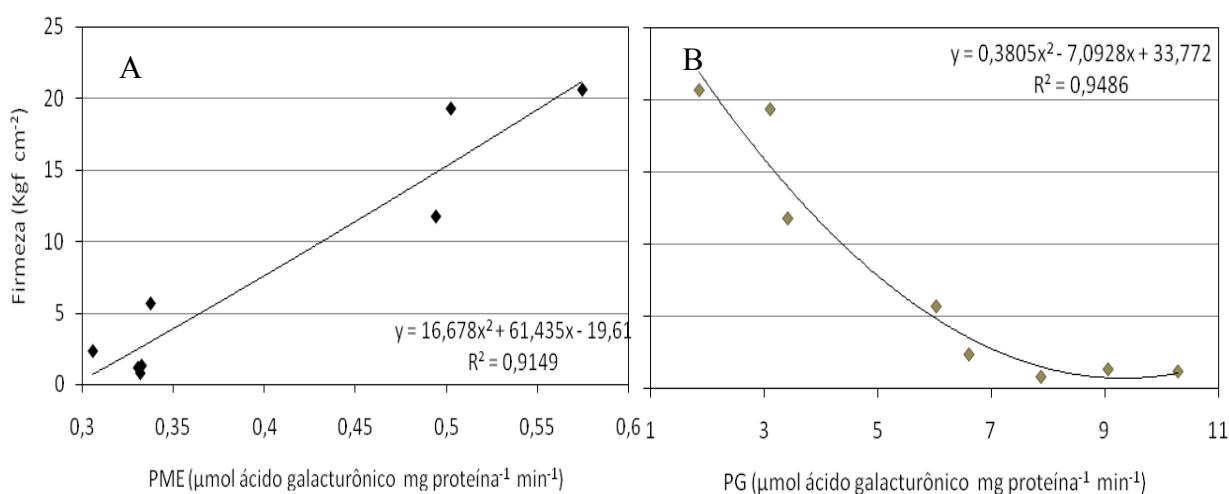


Figura 5- Correlação entre as atividades da pectinametilesterase (PME) (A), poligalacturonase (PG) (B) e firmeza da polpa de frutos de mamoeiro cv. Golden. R^2 = coeficiente de determinação.

Giovane *et al.* (2004) discutem que a PME atua regulando a distribuição e o número de grupos carboxílicos livres ao longo da molécula de pectina. Essa regulação influencia não somente as propriedades da pectina como também da rigidez da parede celular.

De forma mais direta, Lohani *et al.* (2004), trabalhando com banana, afirmam que a atividade da PG aumenta continuamente em concomitante diminuição da PME, o que é presumivelmente correlacionado com a preferência por determinados substratos.

Observa-se na Figura 5 que a firmeza apresentou uma correlação significativamente negativa com a atividade da PG ($r = -0,91226$). A forte correlação entre a firmeza da polpa e a atividade da PG indicou que, quanto maior a atividade da PG, menor a firmeza da polpa. Nos estádios mais avançados do amadurecimento, quanto maior a atividade enzimática maior será a perda da firmeza, uma vez que a enzima atua efetivamente na despolimerização dos componentes da parede celular, em específico na lamela média (Antunes *et al.*, 2006).

Diferentemente da PME que pode estar indiretamente envolvida com as modificações da parede celular, a PG, que atua logo na sequência tem atividade mais pronunciada sobre a modificação da parede celular, uma vez que promove despolimerização da cadeia agindo sobre os polímeros de ácido galacturônico (Anthon *et al.*, 2002), o que pode ainda ser reforçado pelos valores de correlação das duas enzimas com a firmeza da polpa.

Também de acordo com estes resultados, D'innocenzo (1996), trabalhando com mamões do grupo Solo, observou que o amaciamento do fruto ocorria também quando a atividade da outra enzima relacionada à degradação de parede celular, a pectinametilesterase (PME), era mínima, e a atividade da PG era máxima.

Um fator que deve ser considerado é a interseção entre as curvas de atividade da PME e da PG no 4^oDAC, que pode ser indicado como o que apresenta o máximo da respiração climatérica para mamões em condições ambiente. Foi o momento onde se observaram as alterações mais pronunciadas na firmeza em relação aos frutos recém-colhidos, e esse sinergismo entre a atividade de ambas as enzimas pode ser o fator preponderante para a manutenção ou perda da integridade da polpa. Neste trabalho observou-se que mamões da cultivar Golden, apresentam uma correlação mais expressiva entre a atividade da PG e a firmeza da polpa, do que entre esta e a atividade da PME.

Após a colheita, os mamões apresentam transformações fisiológicas rápidas, que reduzem sua capacidade de armazenamento. Dessa forma, o conhecimento da atividade de enzimas que agem sobre os atributos físicos e físico-químicos pode auxiliar no desenvolvimento de métodos apropriados de manuseio e preservação da qualidade desde a colheita até o consumo.

CONCLUSÕES

- A PME mostrou um declínio ao longo da pós-colheita acompanhada por uma queda da firmeza da polpa proporcional a esse declínio;

- A atividade e a expressão da PME tiveram comportamentos antagônicos evidenciando proporcionalidade em função do alto requerimento dos transcritos na fase inicial do amadurecimento;
- O declínio da atividade da PME foi acompanhado pelo acúmulo de transcritos para esta enzima, apresentando-se bastante expressa já nos últimos dias do amadurecimento.
- A enzima poligalacturonase (PG) é a que apresenta maior correlação com a firmeza da polpa;
- Existe um sinergismo entre a atividade da PME e da PG, que pode ser um dos fatores responsáveis pelo amolecimento da polpa dos frutos;
- A interseção entre os níveis de atividade para as duas enzimas acontece no 4ºDAC, momento em que se observam as alterações mais pronunciadas na integridade da polpa.

AGRADECIMENTOS

Ao Banco do Nordeste pelo financiamento do projeto, ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e à Fazenda do Sr. Paulo Sagrillo pelo fornecimento dos frutos.

REFERÊNCIAS

ABELES, F.B.; TAKEDA F. Increased cellulase activity during blackberry fruit ripening.

HortScience, Alexandria, v.24(5): 851, 1989.

ALEXANDER, L.; GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.53, p.2039-2055, 2002.

ANTUNES, L.E.C.; GONÇALVES, E.D.; TREVISAN, R. Alterações da atividade da poligalacturonase e pectinametilesterase em amora-preta (*Rubus* spp.) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.12 (1), p. 63-66, 2006.

BICALHO, U. de O. 1998 *Vida útil pós-colheita de mamão submetido a tratamento com cálcio e filme de PVC*. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 145p. (Tese doutorado), 1998.

BICALHO, U. de O.; CHITARRA, A.B.; CHITARRA, M.I.F. Modificações texturais em mamões subtidos à aplicação póscolheita de cálcio e embalagens PVC. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p.136-146, 2000.

BRUMMELL, D.A.; HARPSTER, M. Cell wall metabolism in fruit softening and quality members during growth and ripening of tomato fruit. **Plant Molecular Biology**, New York, v.39, p.311-340, 2001.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL-FAEPE, 2005. 785 p.

COLLMER, A.; RIED, J.L.; MOUNT, M.S. Assay methods for pectic enzymes. **Methods in Enzymology**. v.161, p. 329–335, 1988.

D'INNOCENZO, M. ; LAJOLO, F.M. Effect of gamma irradiation on softening changes and enzyme activities during ripening of papaya fruit. **Journal of Food Biochemistry**. v. 25, p. 425-438, 2001.

DRAYE, M.; CUTSEM, P.V. Pectin methylesterase induce an abrupt increase of acidic pectin during strawberry fruit ripening. **Journal of Plant Physiology**. v. 165, p.1152-1160, 2008

FAYYAZ , A.; ASBI, B.A.; GHAZALI, H. M.; CHE MAN, Y.B.; JINAP, S. Kinetics of papaya pectinesterase. **Food Chemistry**. v.53, p. 129-135, 1995.

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

GIOVANE, A.; SERVILLOA, L.; BALESTRIERIA, C.; RAIOLA, B. A.; D'AVINO, C. R.; TAMBURRINI, C. M.; CIARDIELLO, C. M.A.; CAMARDELLA, L. Pectin methylesterase inhibitor. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1696, p. 245–252, 2004.

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

GOULAO, L.F.; COSGROVE, D.J.; OLIVEIRA, C.M. Cloning characterisation and expression analyses of cDNA clones encoding cell wall-modifying isolated from ripe apples. **Postharvest Biology and Technology**. v.48, p. 37-51, 2008.

HAGERMAN, A.E.; Austin, P. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.34, p.440–444, 1986.

HARRIMAN, R.W. et al. Molecular cloning of tomato pectin methylesterase gene and its expression in Rutgers, ripening inhibitor, non ripening, and Never Ripe tomato fruits. **Plant Physiology**, Rockville, v.97, p.80-87, 1991.

JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, London, v.40, p. 2931–2944, 2005.

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.

LAPPONI, J.C. **Estatística usando excel**. São Paulo: Lapponi Treinamento e Editora Ltda., 2000.

LIMA, L.C.de O.; SCALON, S. de P.Q.; SANTOS, J.E.S. Qualidade de mangas (*Mangifera indica*) cv. 'Haden' embaladas com filme de PVC durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas. v.18, p. 55-63, 1996.

LIU, J.; GOH, C.; LOH, C.; LIU, P.; PUA, E. A method for isolation of total RNA from fruit tissues of banana. **Plant Molecular Biology Reporter**, Amsterdam, v.16, p.1-6, 1998.

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 Technology**. v.31, p. 119-126, 2004.

- MANRIQUE, G.D.; LAJOLO, F.M. Cell-wall polysaccharide modifications during postharvest ripening of papaya fruit (*Carica papaya*). **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 33, p. 11-26, 2004.
- OLIVEIRA, M. A. B.; VIANNI, R.; SOUZA, G.; ARAÚJO, T. M. R. Caracterização do estágio de maturação do papaia 'Golden' em função da cor. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 559-561, 2002.
- PAULL, R. E.; CHEN, N. J. Postharvest variation in cell wall-degrading enzymes of papaya (*Carica papaya* L.) during fruit ripening. **Plant Physiology**, Washington, v.72, p. 382-385, 1983.
- PIMENTA, C.J.; VILELA, E.R.; CARVALHO JÚNIOR C. de. Componentes de parede celular de grãos de frutos de café (*Coffea arabica* L.) submetidos a diferentes tempos à espera da secagem. **Acta Scientiarum Agronomy**. v.26, p. 203-209, 2004.
- RESENDE, J.M.; CHITARRA, M.I.F.; MALUF, W.R.; CHITARRA, A.B.; SAGGIN JÚNIOR, O.J. Atividade de enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase durante o amadurecimento de tomates do grupo multilocular. **Horticultura Brasileira**. v. 22, p. 206-212, 2004.
- RITZINGER, C.H.P.; SOUZA, J.S. 2000. **Mamão: Fitossanidade**. Cruz das Almas. EMBRAPA, 91p.
- ROLIM, S.G., COUTO, H.T.Z., JESUS, R.M. Mortalidade e recrutamento de árvores na Floresta Atlântica de Linhares (ES). **Sci. Forest**. v. 55, p. 49-69, 1999.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. ;MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).
- SANTOS, K.T. Atividade fotoquímica em folhas do mamoeiro *Carica papaya* L. durante o período reprodutivo e caracterização da ontogenia dos frutos. 2007. 45p. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo- UFES, 45p. (Dissertação mestrado), 2007.

SILVA, J. G. F. DA; NÓBREGA, N. E. F. DA; RAMOS, H. E. A. Estudo do comportamento médio mensal de elementos meteorológicos da região produtora de mamão de Linhares – ES. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura. **Anais...** Vitória, 2008.

VIEIRA, D.P. **Técnicas de PCR: Aplicações e padronização de reações**. Acesso em: 10 de outubro de 2008. Disponível em: www.etall.hpg.com.br

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

WAKABAYASHI, K. Changes in Cell Wall Polysaccharides During Fruit Ripening. **Journal Plant Research**.v. 113, p. 231-237, 2000.

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

ZHANG, L.; PAULL, R. Variation in the ripening characteristics of papaya. **Acta Horticulture**. v. 269, p. 119 -124, 1990.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho visou comparar características físicas, bioquímicas e moleculares de frutos de mamoeiro com o intuito de se estabelecer as relações entre elas. Diversas associações foram bastante significativas do ponto de vista de se avaliar a qualidade final dos frutos que chegam ao consumidor.

Relações entre a firmeza da polpa e a atividade das enzimas PME e PG, demonstraram que há uma forte dependência entre os diversos fatores e que eles são mais representativos para caracterizar o aspecto geral de um fruto do que quando analisados separadamente.

Uma vez que a vida útil dos frutos é relativamente curta, ensaios que permitam estabelecer relações que minimizem a perda pós-colheita, seja por atividade enzimática acelerada ou mesmo por alterações físicas da polpa, são importantes para que se possa entender a influência do conjunto de atributos sobre o resultado final. Estes resultados, além de confirmar observações feitas por outros autores, exploram a real interdependência de fatores e modificações que alteram finalmente o aspecto dos frutos.

As análises baseadas no padrão de expressão e atividade da pectinametilesterase demonstraram que ambas tiveram um perfil oposto, claramente explicado pela observação de cada parâmetro avaliado. A menor expressão de transcritos na fase de maior atividade enzimática pode estar relacionada a uma rápida utilização dos oligonucleotídeos para a síntese da enzima durante o período de maior requerimento da mesma, ou seja, quando a PME apresentava-se com alta atividade durante a pós-colheita, o RNAm parece ter sido rapidamente requerido para rápida síntese e utilização desta enzima.

O estudo integrado de características físicas, bioquímicas e moleculares pode esclarecer lacunas a respeito de modificações ainda incertas acerca dos eventos gerais de amaciamento da polpa por desagregação dos polímeros da parede celular. Pelo observado neste estudo, muitos fatores modificam-se em dependência da intensidade e da velocidade com que outros ocorrem e podem certamente estar associados à transformações intrínsecas ou extrínsecas ao fruto, tanto na pré quanto na pós-colheita.

Pôde ser observado também, por análise de resultados expostos por outros autores, que muitas enzimas, por atuarem de forma específica para um determinado fruto, devem ser analisadas de maneira individual para um determinado fruto, a fim de se compreenderem os processos que levam ao amaciamento da polpa.

5 REFERÊNCIAS

AHRENS, M. J.; HUBER, D. J. Physiology and firmness determination of ripening tomato fruit. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 78, n. 1, p. 8-14, 1990.

ALVES, R. E.; SOUZA FIHO, M. de S. M. de; BASTOS, M. S. R.; FILGUEIRAS, H. A. C.; BORGES, M. de F. Pesquisa em processamento mínimo de frutas no Brasil. In: **Encontro nacional sobre processamento de frutas e hortaliças**, 2., 2000. Palestras...Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. p.75-88.

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

BRANDAO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. **Polímeros**, São Carlos, v. 9, n. 3, 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.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL-FAEPE, 2005. 785 p.

COLLMER, A., RIED, J.L., MOUNT, M.S. Assay methods for pectic enzymes. **Methods in Enzymology**. v.161, p. 329–335,1988.

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

GIOVANE, A.; SERVILLO, L.; BALESTRIERI, C.; RAIOLA, A.; D'AVINO, R.; TAMBURRINI, M.; CIARDIELLO, M.A.; CAMARDELLA, L. Pectin methylesterase inhibitor. **Biochimica et Biophysica Acta** . v.1696, p. 245– 252, 2004.

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

GOUVEIA, M.M.C.; BALDÉ, A.; PAIS, M.S.; MOOIBROEK, A.; RECOURT, K. Characterization of pectinase cDNAs in fruit of *Carica papaya* L. Não publicado (EMBL no.: Y07899; NCBI seq. ID: 1545900), 1996.

HAGERMAN, A.E.; Austin, P. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.34, p.440–444, 1986.

LAPPONI, J.C. **Estatística usando excel**. São Paulo: Lapponi Treinamento e Editora Ltda., 2000.

MOUSTACAS, A. M.; NARI, J.; BOREL, M.; NOAT, G.; RICARD, J. Pectin methylesterase, metal ions and plant cell wall extension – the role of metal ions in plant cell wall extension. **Biochemical Journal**, v. 279, p.351–354, 1991.

NARI, J., NOAT, G., DIAMANTIDIS, G., WOULDSTRA, M., AND RICARD, J. Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. 3. Interplay between limited cell-wall autolysis, pectin methyl esterase-activity and electrostatic effects in soybean cell walls. **European Journal Biochemistry**. v. 155, p.199–202, 1986.

NELSON, N.A. A photometric adaptation of Somogy method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.135, p.136-175, 1944.

OLIVEIRA, M. A. B.; VIANNI, R.; SOUZA, G.; ARAÚJO, T. M. R. Caracterização do estágio de maturação do papaia ‘Golden’ em função da cor. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 559-561, 2002.

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

RICARD, J.; NOAT, G. Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. 1. A theory of the ionic control of a complex multi-enzyme system, **European Journal Biochemistry**. v. 155, p. 183–190, 1986.

RITZINGER, C.H.P.; SOUZA, J.S. . 2000. **Mamão: Fitossanidade**. Cruz das Almas. EMBRAPA, 91p.

SANTOS JUNIOR, A. M. dos; MALUF, W. R.; FARIA, M. V.; LIMA, L. C. de O.; CAMPOS, K. P. de; LIMA, H. C. de; ARAÚJO, F. M. M. C. de. Comportamento pós colheita das características químicas, bioquímicas e físicas de frutos de tomateiros heterozigotos nos locos *alcobaça* e *ripening inhibitor*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 749-757, jul./ago. 2003.

SILVA, J. G. F. DA; NÓBREGA, N. E. F. DA; RAMOS, H. E. A. Estudo do comportamento médio mensal de elementos meteorológicos da região produtora de mamão de Linhares – ES. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura. **Anais...** Vitória, 2008.

SOMOGY, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**. 195:19-23. 1952.

XISTO, A.L.R.P.; ABREU, C.M.P.; CORRÊA, A.D.; SANTOS, C.D. Textura de goiabas “Pedro Sato” submetidas à aplicação de cloreto de cálcio. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 113-118, 2004.

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, p.20-21, 1984.