

ARMAZENAMENTO DE FRUTOS DE MAMOEIRO: INVESTIGAÇÃO  
DA PARTICIPAÇÃO DA OXIDASE ALTERNATIVA E DA PROTEÍNA  
DESACOPLADORA NA RESPIRAÇÃO EM MITOCÔNDRIAS  
ISOLADAS DA POLPA DO FRUTO

**MARCOS GÓES OLIVEIRA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO - UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
Maio - 2012

ARMAZENAMENTO DE FRUTOS DE MAMOEIRO: INVESTIGAÇÃO  
DA PARTICIPAÇÃO DA OXIDASE ALTERNATIVA E DA PROTEÍNA  
DESACOPLADORA NA RESPIRAÇÃO EM MITOCÔNDRIAS  
ISOLADAS DA POLPA DO FRUTO

**MARCOS GÓES OLIVEIRA**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor em Produção Vegetal”.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO - UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
Maio - 2012

ARMAZENAMENTO DE FRUTOS DE MAMOEIRO: INVESTIGAÇÃO  
DA PARTICIPAÇÃO DA OXIDASE ALTERNATIVA E DA PROTEÍNA  
DESACOPLADORA NA RESPIRAÇÃO EM MITOCÔNDRIAS  
ISOLADAS DA POLPA DO FRUTO

**MARCOS GÓES OLIVEIRA**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor em Produção Vegetal”.

Aprovada em 03 de Maio de 2012.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Vanildo Silveira (D.Sc., Biotecnologia) – UENF

---

Prof. Marcelo Gomes da Silva (D.Sc., Física) – UENF

---

Prof. Eldo campos (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UFRJ

---

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva (D.Sc., Biologia Vegetal) – UFV

---

Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira (D.Sc., Biologia Vegetal) – UENF  
(Orientador)

À minha querida esposa Camilla e ao meu filho Zion, à tia Judite e aos meus familiares, que sempre me apoiaram nas minhas escolhas e, sem o seu apoio e dedicação, não conseguiria chegar à pós-graduação.

Dedico e ofereço esse trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me guiar em todos os momentos da minha vida;

À minha querida e adorável companheira Camilla, minha sogra Maria Do Carmo e ao meu filho Zion, pelo apoio, confiança e compreensão nos momentos de dificuldades;

Aos meus pais Manoel e Miralva, pelo incentivo e carinho no decorrer da minha vida;

Ao professor Jurandi G. de Oliveira, pelo aprendizado, apoio e incentivo nas minhas atividades acadêmicas e pela amizade durante todo o tempo da minha formação;

Ao professor João Daniel Arrabaça, pela colaboração no treinamento para as avaliações das mitocôndrias;

Ao professor Marco Aurélio Pedron e Silva, pelo treinamento e apoio nas avaliações das mitocôndrias;

À equipe do Prof. Marcelo Gomes da Silva, ao Sávio Figueira Corrêa e Willy pela colaboração e paciência nas etapas de avaliação de gases no Laboratório de Ciências Físicas do CCT-UENF;

Aos amigos do Setor de Fisiologia Vegetal, pela amizade e estímulo;

A UENF, por fornecer as condições para a realização deste trabalho;

Ao programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, por ter me concedido a oportunidade para realização deste projeto;

A CAPES, pela bolsa concedida;

A Caliman Agrícola S/A, pela parceria e apoio técnico para realização desta pesquisa;

Aos professores do Setor de Fisiologia Vegetal, pelo aprendizado diário;

A todos os amigos em especial ao Anderson, Adilson e a Ana Paula que, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
2.1. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO MAMOEIRO .....	4
2.2. METABOLISMO DO MAMÃO.....	5
2.2.1 <i>Padrão Respiratório</i> .....	5
2.2.2 <i>Fisiologia do amadurecimento</i> .....	7
2.2.3 <i>Produção de etileno</i> .....	8
2.3. CONSERVAÇÃO DOS FRUTOS - ARMAZENAMENTO REFRIGERADO .....	10
2.4. MITOCÔNDRIAS DE PLANTAS.....	11
2.4.1. <i>Oxidase Alternativa</i> .....	13
2.4.2. <i>Proteína desacopladora em plantas (UCP)</i> .....	14
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	16
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>4. TRABALHOS.....</b>	<b>17</b>
4.1. RESPIRAÇÃO RESISTENTE AO CIANETO, À PROTEÍNA DESACOPLADORA MITOCONDRIAL E À EMISSÃO DE ETILENO DURANTE O AMADURECIMENTO DO MAMÃO ARMAZENADO À TEMPERATURA AMBIENTE. ....	17
4.1.1 <i>Resumo</i> .....	17
4.1. CYANIDE-RESISTANT RESPIRATION, MITOCHONDRIAL UNCOUPLING PROTEIN ACTIVITY AND ETHYLENE EMISSION DURING RIPENING OF PAPAYA STORED AT CONTROLLED TEMPERATURE .....	18
4.1.2. <i>ABSTRACT</i> .....	18
4.1.3. <i>Introdução</i> .....	19
4.1.4. <i>Material e Métodos</i> .....	21
4.1.4.1. Material vegetal e condições de armazenamento .....	21
4.1.4.2. Avaliação dos atributos físico – químicos.....	22
4.1.4.3. Avaliação da emissão dos gases CO <sub>2</sub> e etileno .....	22
4.1.4.4. Isolamentos das mitocôndrias .....	23
4.1.4.4.1. Atividade respiratória .....	24
4.1.4.5. Avaliação do potencial elétrico de membrana .....	25
4.1.4.6. Análises estatísticas .....	25
4.1.5. <i>Resultados e discussão</i> .....	26
4.1.6. <i>Conclusão</i> .....	44
4.1.7. <i>Referências bibliográficas</i> .....	44
4.2 PARTICIPAÇÃO DA OXIDASE ALTERNATIVA E DA PROTEÍNA DESACOPLADORA NA CONSERVAÇÃO DE FRUTOS DE MAMÃO PÓS-RESFRIAMENTO.....	55
4.2.1. <i>Resumo</i> .....	55

4.2. STORAGE OF PAPAYA FRUIT UNDER LOW TEMPERATURE: INVOLVEMENT OF ALTERNATIVE ROUTES OF RESPIRATION IN ISOLATED MITOCHONDRIA AND PRESERVATION OF FRUITS AFTER COOLING.....	56
4.2.2 ABSTRACT.....	56
4.2.3. <i>Introdução</i> .....	57
4.2.4. <i>Material e Métodos</i> .....	60
4.2.4.2. Avaliação dos atributos físico-químicos.....	61
4.2.4.3. Avaliações da emissão de CO <sub>2</sub> e etileno.....	61
4.2.4.4. Isolamentos das mitocôndrias.....	62
4.2.4.4.1. Atividade respiratória.....	62
4.2.4.5. Avaliação do potencial elétrico de membrana.....	64
4.2.4.6. Análises estatísticas.....	64
4.2.3. <i>Resultados</i> .....	64
4.2.4. <i>Conclusão</i> .....	83
4.2.5. <i>Referências bibliográficas</i> .....	83
4.2.6 <i>Considerações Finais</i> .....	95
4.2.7 <i>Referências bibliográficas</i> .....	96

## LISTA DE TABELAS

4. TRABALHOS .....	17
4.1. Respiração resistente ao cianeto, à proteína desacopladora mitocondrial e à emissão de etileno durante o amadurecimento do mamão armazenado à temperatura ambiente.....	17
Tabela 1 – Parâmetros de cor $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ e ângulo $hue$ ( $h^\circ$ ), firmeza da polpa (N) e teor de SS ( $^\circ$ Brix) em frutos de mamão ‘Golden’ armazenados a $25^\circ\text{C}$ , por até nove dias.....	27
Tabela 2 - Taxa de consumo de $\text{O}_2$ nos estados 3 e 4 e controle respiratório de mitocôndrias isoladas de polpa de frutos de mamão ‘Golden’ armazenados a $25^\circ\text{C}$ , por até nove dias. Os dados se referem às médias $\pm$ desvio padrão de três diferentes preparações mitocondriais.....	32
Tabela 3 - Potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) de mitocôndrias isoladas de polpa de frutos de mamão ‘Golden’ armazenados à temperatura de $25^\circ\text{C}$ por nove dias. Os dados se referem às médias $\pm$ desvio padrão de três diferentes preparações mitocondriais. Mito: se refere ao potencial inicialmente estabelecido, ao se adicionar mitocôndrias isoladas ao meio de reação; + LA: adição de ácido linoléico; + LA + BSA + ATP: adição de ácido linoléico, seguido das adições de BSA e ATP, seguida de ATP; + LA + BSA + ATP + CCCP: adição de CCCP às adições anteriores.....	39
4.2 Participação da oxidase alternativa e da proteína desacopladora na conservação de frutos de mamão pós-resfriamento.....	55
Tabela 1 – Taxa de consumo de $\text{O}_2$ nos estados 3 e 4 e controle respiratório de mitocôndrias isoladas de polpa de mamão ‘Golden’ armazenados por 4, 12 e 20 dias sob baixa temperatura a $12^\circ\text{C}$ , com amostragens aos 0, 2, 4 e	



6 dias de prateleira a 25°C..... 74

Tabela 2 – Consumo de O<sub>2</sub> de mitocôndrias isoladas de polpa de mamão ‘Golden’ armazenados por 4, 12 e 20 dias sob baixa temperatura a 12°C, com amostragens aos 0, 2, 4 e 6 dias de prateleira a 25°C demonstrando a participação da UCP. Os dados se referem às médias ± desvio padrão de três diferentes preparações mitocondriais..... 79

Tabela 3 - Potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) de mitocôndrias isoladas de polpa de mamão ‘Golden’ armazenados por 4, 12 e 20 dias sob baixa temperatura a 12°C, com amostragens aos 0, 2, 4 e 6 dias de prateleira a 25°C demonstrando a participação da UCP. Os dados se referem às médias ± desvio padrão de três diferentes preparações mitocondriais..... 81

## LISTA DE FIGURAS

4. TRABALHOS .....	17
4.1. Respiração resistente ao cianeto, à proteína desacopladora mitocondrial e à emissão de etileno durante o amadurecimento do mamão armazenado à temperatura ambiente.....	17
Figura 1 – Imagens fotográficas das alterações visuais durante o amadurecimento de frutos de mamão 'Golden' ao longo de seu armazenamento por nove dias. E0 = fruto no dia da colheita no estágio zero de maturação; os números indicam o número de dias de armazenamento após a colheita.....	27
Figura 2 – Taxas respiratórias e de emissão de etileno em frutos de mamão 'Golden' armazenados a 25°C durante nove dias de armazenamento.....	29
Figura 3 – Participação das vias do citocromo c oxidase (COX) e da oxidase alternativa (AOX) no consumo total de O <sub>2</sub> de mitocôndrias isoladas de polpa de frutos de mamão armazenados a 25 °C por nove dias. As barras representam as médias ± desvio padrão de três diferentes preparações mitocondriais. Os dados relativos ao sétimo e oitavo dia de armazenamento foram perdidos.....	34
Figura 4 – Atividade respiratória de mitocôndrias isoladas de polpa de frutos de mamão armazenados a 25 °C por até nove dias. O meio de reação foi suplementado com 300 µM de propranolol, 1 mM de ditioneitol (DTT) e 0,15 mM de piruvato para estimular a máxima atividade da AOX. Os dados representam a média ± desvio padrão de três ensaios independentes.....	37
Figura 5. Consumo de O <sub>2</sub> em mitocôndrias isoladas de polpa de mamão armazenado a 25 °C por até nove dias demonstrando a participação da UCP. (E0) Frutos recém-colhidos antes de iniciar o armazenamento; Frutos	

armazenados por um (E1), dois (E2), três (E3), quatro (E4), cinco (E5), seis (E6) e nove dias (E9). Designação de declividade (em negrito) refere-se a: (1) - respiração no estado 3, representa a taxa respiratória de mitocôndrias acopladas; (2) - respiração no estado 4 na presença de 10  $\mu$ M deLA, representa a taxa respiratória total da mitocôndria que inclui o bombeamento de prótons para o espaço intermembranas pelos complexos I, III e IV com a participação da UCP transportando prótons de volta para a matriz sem passar pela ATP sintase e (3) – respiração no estado 4 na presença do BSA 0,5 % e ATP 0,1 mM, representa a taxa respiratória total da mitocôndria com a UCP inibida..... 41

4.2 Participação da oxidase alternativa e da proteína desacopladora na conservação de frutos de mamão pós-resfriamento..... 55

Figura 1 – Imagens fotográficas da visão geral dos frutos após o armazenamento à temperatura de 12°C e durante o período de prateleira a que os frutos foram submetidos..... 65

Figura 2 – Parâmetros de cor  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e ângulo de cor *hue* ( $h^\circ$ ) em frutos de mamoeiro ‘Golden’ armazenados por 4, 12 e 20 dias sob baixa temperatura a 12°C, com amostragens aos 0, 2, 4 e 6 dias de prateleira a 25°C. O controle representa os frutos avaliados no primeiro dia de coleta. Barras verticais indicam o desvio padrão da média..... 66

Figura 3 – Teor de sólidos solúveis (A) e firmeza da polpa (B) em frutos de mamoeiro ‘Golden’ armazenados por 4, 12 e 20 dias sob baixa temperatura a 12°C, com amostragens aos 0, 2, 4 e 6 dias de prateleira a 25°C. O controle representa os frutos avaliados no primeiro dia de coleta. Barras verticais indicam o desvio padrão da média..... 67

Figura 4 – Taxa de emissão de etileno em frutos de mamão ‘Golden’ mantidos por 4, 12 e 20 dias sob baixa temperatura a 12°C com amostragens aos 0, 2, 4 e 6 dias de prateleira a 25°C. O controle

representa os frutos avaliados no primeiro dia de coleta. Barras verticais indicam o desvio padrão da média..... 69

Figura 5 – Taxa de emissão de CO<sub>2</sub> em frutos de mamão Golden mantidos por 4, 12 e 20 dias sob baixa temperatura a 12°C, com amostragens aos 0, 2, 4 e 6 dias de prateleira a 25°C. O controle representa os frutos avaliados no primeiro dia de coleta. Barras verticais indicam o desvio padrão da média..... 71

Figura 6 – Atividade respiratória de mitocôndrias isoladas de polpa de frutos de mamoeiro 'Golden' armazenados por 4, 12 e 20 dias sob baixa temperatura a 12°C, com amostragens aos 0, 2, 4 e 6 dias de prateleira a 25°C. O controle representa os frutos avaliados no primeiro dia de coleta. Barras verticais indicam o desvio padrão da média..... 75

Figura 7 – Atividade respiratória da oxidase alternativa em mitocôndrias isoladas de polpa de frutos de mamoeiro 'Golden' armazenados por 4, 12 e 20 dias sob baixa temperatura a 12°C, com amostragens aos 0, 2, 4 e 6 dias de prateleira a 25°C. Os valores são as médias ± desvio padrão da média de três repetições, de três diferentes preparações mitocondriais..... 78

## RESUMO

**Oliveira, M. G.; M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Maio de 2012. Armazenamento de frutos de mamoeiro: investigação da participação da oxidase alternativa e da proteína desacopladora na respiração em mitocôndrias isoladas da polpa do fruto. Orientador: Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira.**

O presente trabalho tem como objetivo verificar mudanças no metabolismo mitocondrial, principalmente a atividade da oxidase alternativa e a proteína desacopladora de mitocôndrias durante o amadurecimento pós-colheita de frutos de mamão 'Golden' armazenados à temperatura de 25°C e verificar se o armazenamento desses frutos sob baixa temperatura (12°C) pode estimular a atividade dessas vias desacopladoras, promovendo uma aceleração do processo respiratório após o retorno à temperatura ambiente, contribuindo, dessa forma, para a redução na vida útil destes frutos. A evolução do amadurecimento do mamão foi acompanhada pela análise dos parâmetros de cor  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e ângulo *hue*, firmeza da polpa e teor de sólidos solúveis (SS). Em cada período de amostragem também foi avaliada a atividade respiratória em mitocôndrias isoladas da polpa do mamão. Os resultados mostraram que ocorreu um aumento na atividade das proteínas AOX e UCP em mitocôndrias isoladas, com aceleração da atividade respiratória durante a evolução no amadurecimento dos frutos de

mamão armazenados a 25 °C. Isso indica que estes sistemas de dissipação de energia devem apresentar importante função durante o processo de amadurecimento dos frutos de mamão. A maior participação da AOX ocorreu no final do amadurecimento, em estreita relação com o aumento da taxa respiratória, enquanto a atividade da UCP foi maior aos cinco dias de armazenamento dos frutos, indicando maior proximidade com o padrão de resposta verificado para a emissão de etileno. Para os frutos armazenados sob refrigeração, de modo geral, não foi observado um pico na produção de etileno e de CO<sub>2</sub> nos frutos previamente refrigerados. Os resultados mostraram a participação da via resistente ao cianeto e a proteína desacopladora mitocondrial no aumento da atividade respiratória do fruto, sendo variável com o tempo de exposição à refrigeração. Os resultados indicam que a maior participação da AOX e UCP ocorreu após 20 dias de refrigeração, em estreita relação com o aumento da taxa respiratória nos frutos intactos, ao contrário da emissão de etileno que apresentou tendência de queda em igual período de armazenamento. Dessa maneira é possível afirmar que longos períodos de refrigeração podem afetar a taxa respiratória na medida em que promovem um estímulo da respiração no período de prateleira, afetando diretamente o produto na fase final de comercialização.

## ABSTRACT

**Oliveira, M. G.; M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Maio, 2012. Storage of papaya fruit: investigation of the involvement of alternative oxidase and protein uncoupling respiration in mitochondria isolated from the fruit pulp. Advisor: Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira.**

The present study aims to determine changes in mitochondrial metabolism, especially the activity of alternative oxidase and uncoupling protein in mitochondria during postharvest ripening of papaya 'Golden' stored at 25 °C and verify that the storage of fruits under low temperature (12 °C) can stimulate the activity of alternative routes, promoting an acceleration of the breathing process after returning to room temperature, thus contributing to the reduction in the useful life of these fruits. The evolution of the ripening of papaya was accompanied by analysis of color parameters L, a \*, b \* and hue angle, fruit firmness and soluble solids (SS). In each sampling period was also assessed respiratory activity in mitochondria isolated pulp of the fruit of the papaya. The results showed that an increase in the activity of proteins AOX and UCP in isolated mitochondria, with acceleration of respiratory activity during evolution in ripening of papaya fruit stored at 25 ° C. This indicates that these systems of energy dissipation must have an important role during the ripening of papaya. The increased participation of

AOX occurred at the end of ripening, in close relation with increased respiratory rate, while the activity was higher at UCP five days storage of fruits, indicating a greater proximity to the response pattern observed for the emission of ethylene. For the fruits stored under refrigeration, in general, there was one peak of CO<sub>2</sub> and ethylene production in fruit previously chilled. The results show the involvement of the track resistant cyanide and uncoupling protein to increase the mitochondrial respiratory activity of the fruit being variable with time of exposure to cooling. The results indicate that the greater participation of AOX and UCP occurred after 20 days of refrigeration, in close relation with the increase in respiratory rate in intact fruit, unlike the emission of ethylene tended to fall in the same period of storage. Thus we can say that long periods of cooling can affect the respiratory rate as an incentive to promote breathing during shelf, directly affecting the product in the final stages of commercialization.



## 1. INTRODUÇÃO

Originário da América tropical, o mamoeiro (*Carica papaya* L.) é cultivado em várias regiões do mundo, sendo atualmente um dos maiores produtores o Brasil, responsável por 25,23% da produção mundial (IBRAF, 2012).

O mamão é um fruto que, quando maduro, apresenta polpa macia, rica em açúcares solúveis e sabor agradável. Consumido em grande parte do mundo e altamente valorizado por seu potencial nutracêutico, é muito procurado pelos mercados interno e externo (Salomão et al., 2007).

Entretanto, por apresentar um padrão de respiração do tipo climatérico, os frutos de mamoeiro são bastante perecíveis, o que pode ser um fator limitante dificultando a sua exportação. Segundo Salomão et al. (2007), a natureza frágil do mamão o torna altamente susceptível a injúrias e moléstias, devido à sua fina casca.

Dada essa alta perecibilidade, o controle do amadurecimento é fundamental para o aumento na vida útil após a colheita, visando o mercado interno e a exportação de frutas. Dessa forma, estudos têm sido feitos para ampliar o conhecimento dos processos bioquímicos envolvidos no desenvolvimento de frutos com o objetivo de elucidar fatores passíveis de manipulação, controle ou interferência, possibilitando modificações que permitam estender a vida útil destes frutos.

A manutenção da qualidade dos frutos de mamoeiro, principalmente durante um período mais prolongado, depende de uma interação entre as condições envolvidas no armazenamento. As principais condições que influenciam na qualidade dos frutos são a temperatura, a umidade relativa e o período de armazenamento.

Neste contexto, o uso de baixas temperaturas durante o armazenamento faz com que os frutos tenham uma vida pós-colheita mais longa. Isto permite a exportação dos frutos por meios de transporte mais demorados, cujo frete é de menor custo, possibilitando, assim, sua competição no mercado internacional com outros exportadores e com as demais frutas existentes na época (Sampaio, 1993).

A manutenção do fruto de mamão sob baixa temperatura aumenta sua vida-útil apenas enquanto o mesmo está sob baixa temperatura. Porém, após a saída deste fruto da condição de resfriamento, o que se observa é uma aceleração do processo de amadurecimento, perdendo rapidamente a pigmentação verde da casca e a consistência da polpa (An e Paull, 1990; Souza et al., 2009). Tais transformações fazem com que o fruto perca, em pouco tempo, a qualidade para o consumo, além de dificultar a sua comercialização, uma vez que se tornam mais susceptíveis a danos mecânicos quando manipulados (Paull et al., 1997).

Diversos estudos na literatura envolvendo outras espécies vegetais, têm demonstrado que a baixa temperatura pode alterar o metabolismo respiratório pela dissipação do gradiente eletroquímico de prótons e que estes efeitos estão relacionados à operação de “rotas alternativas” como a respiração resistente ao cianeto e a atuação da proteína desacopladora (Duque e Arrabaça, 1999; González-Meler et al., 1999; Calegario et al., 2003; Pinheiro et al., 2004).

As informações obtidas a cerca do funcionamento das rotas alternativas em mitocôndrias de mamão poderão ajudar em um possível ajustamento de um protocolo de manejo em pós-colheita (temperatura ideal e tempo de exposição) de frutos de mamoeiro, visando o prolongamento da vida-útil dos frutos.

Este trabalho tem como objetivo verificar as mudanças no metabolismo mitocondrial, principalmente a atividade da alternativa oxidase e da proteína desacopladora de mitocôndria, durante o amadurecimento pós-colheita de frutos de mamão ‘Golden’ armazenados à temperatura de 25°C. Além disso, o trabalho

irá verificar se o armazenamento dos frutos de mamão sob baixa temperatura (12°C) pode estimular a atividade das rotas alternativas da respiração em mitocôndrias isoladas da polpa do fruto de mamão, promovendo uma aceleração do processo respiratório após o retorno à temperatura ambiente, contribuindo, dessa forma, para a redução na vida útil destes frutos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Importância econômica do mamoeiro

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de mamão, com produção de 1,9 milhões de toneladas no ano de 2010, atrás apenas da Índia. O Brasil também é o segundo maior exportador mundial de mamão *in natura* depois do México, segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAOSTAT, 2012). Quanto à produção nacional, os principais produtores são os Estados da Bahia (902 mil toneladas), o Espírito Santo (630 mil toneladas), o Rio Grande do Norte (106 mil toneladas) e o Ceará (100 mil toneladas), de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2012).

O volume de mamão exportado por produtores da Bahia cresceu sete vezes em dez anos, atingindo a marca recorde de 7,6 mil toneladas vendidas para outros países em 2010. Principal produtor de mamão do Brasil, a Bahia tem no Extremo-Sul e o Oeste do estado as principais áreas de cultivo. No ano passado, o destaque da produção foi para o município de Luís Eduardo Magalhães, que, com apenas três fazendas, foi responsável por mais da metade das exportações de mamão do estado com cerca de 4,6 mil toneladas (IBGE 2012).

Apesar de o estado da Bahia ser responsável pela maior produção nacional do mamão, é no estado do Espírito Santo que se observa o principal polo exportador de mamão do país, de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Frutas (IBRAF, 2012). O estado abriga as maiores produtoras e exportadoras de mamão, que há mais de 10 anos exportam tanto para os Estados Unidos, quanto para a Europa (Ruggiero et al., 2003; Prates, 2005), respondendo por 50% do total de exportação nacional.

No Espírito Santo os principais municípios produtores são Linhares e Pinheiros, que apresentam um elevado nível em infraestrutura comercial e qualidade do produto. Nestas regiões predomina a produção de mamão do grupo Solo em Linhares e do grupo Formosa em Pinheiros (Martins, 2003).

A manutenção desse nível de comercialização, bem como a conquista de novos mercados depende da capacidade dos exportadores brasileiros em se adequar aos crescentes custos do transporte aéreo, como também a extensão do tempo de vida-útil dos frutos para o transporte marítimo (Assis, 2005).

## **2.2. Metabolismo do mamão**

### **2.2.1 Padrão Respiratório**

A respiração tem como função principal o fornecimento de energia prontamente disponível (adenosina trifosfato) para as atividades celulares, além, da sua fundamental participação no fornecimento de intermediários (estruturas carbônicas) de várias rotas biossintéticas (p. ex. síntese de aminoácidos, de açúcares, de componentes de parede celular, etc.) (Chitarra e Chitarra, 2005).

Após a colheita do fruto, a respiração e a transpiração são os principais processos fisiológicos responsáveis pela perda de qualidade do produto. Toda ação que vise prolongar a vida-útil dos frutos após a colheita deve atentar para o controle destes dois processos (Paull et al., 1997). O controle da transpiração é feito por meio do resfriamento do fruto (redução do calor latente) ou aumentando-se a umidade relativa da atmosfera que envolve o fruto (Ferguson et al., 1999).

A respiração resulta em modificações profundas no perfil de diversos compostos orgânicos (proteínas, carboidratos, ácidos orgânicos, voláteis, etc.) de um fruto. Algumas destas modificações podem ser interessantes, enquanto que

outras podem ser altamente indesejáveis sob o ponto de vista da qualidade do produto para o consumidor (Sams, 1999). Em condições não controladas, estas mudanças podem levar rapidamente à perda de firmeza da polpa, ao aumento no conteúdo de líquido extracelular e ao aumento na acidez da polpa dentre outros. Tais alterações tornam o fruto mais susceptível ao ataque de micro-organismos e à perda de umidade, levando à senescência deste órgão (Ali e Lazan, 1998). A respiração, portanto, é um índice de atividade fisiológica e potencial de armazenamento de um fruto (Chitarra e Chitarra, 2005).

Para a conservação dos frutos é desejável a redução na atividade respiratória, porém nunca a repressão total, pois as consequências do metabolismo anaeróbico frequentemente resultam na perda de qualidade dos frutos.

Segundo Maia et al. (2009), cada espécie possui taxa respiratória própria e mesmo dentro da mesma espécie, esta atividade pode variar entre as cultivares. Fatores tais como a relação entre a área superficial e o volume, aumento da temperatura, aumento da concentração de oxigênio, acúmulo de etileno e danos mecânicos, também influenciam a atividade respiratória dos frutos. Este padrão de amadurecimento caracteriza o mamão como bastante perecível em pós-colheita (Paull, 1993).

Os frutos de um modo geral podem ser classificados como climatérico ou não climatérico de acordo com a ausência ou presença da produção autocatalítica do etileno durante a maturação (Chaves e Melo-Faria, 2006). Frutos climatéricos como tomate, abacate, banana e manga são caracterizados pelo acentuado incremento da produção de etileno e atividade respiratória durante o amadurecimento. Por outro lado os frutos não climatéricos como morango, uvas e os citrus, não apresentam grandes mudanças no padrão respiratório durante o amadurecimento.

O mamão é considerado um fruto climatérico, pois apresenta em determinada etapa de seu ciclo vital, um aumento rápido e acentuado na atividade respiratória e produção de etileno, com amadurecimento imediato, podendo amadurecer na planta ou fora dela se colhidos fisiologicamente maduros (Chitarra e Chitarra, 2005; Bapat et al., 2010).

## 2.2.2 Fisiologia do amadurecimento

Durante o desenvolvimento, os frutos passam, de modo geral, por quatro diferentes estádios fisiológicos que se iniciam após a fertilização: 1) o crescimento, marcado por sucessivas divisões celulares e alargamento celular, seguido pela 2) maturação, caracterizada por mudanças bioquímicas e estruturais dos frutos; 3) o amadurecimento, processo irreversível marcado por mudanças físicas e químicas que afetam a qualidade sensorial do fruto e, finalmente; 4) a senescência, processo que ocorre após a maturidade fisiológica e que, por ser predominantemente marcado por processos degradativos, resulta na morte dos tecidos (Balbino e Costa, 2003; Chitarra e Chitarra, 2005).

O tempo de desenvolvimento do mamão é variável em função do período do ano em que esses se desenvolvem devido às mudanças de fatores como temperatura, principalmente, e umidade relativa do ar. Em geral, o tempo entre a antese e a colheita pode variar cerca de 120 dias - para frutos que se desenvolvem no período mais quente do ano - até aproximadamente 180 dias - nos frutos desenvolvidos no período de temperaturas mais baixas (Berilli et al., 2007).

O amadurecimento é a fase mais estudada na pós-colheita de frutos, principalmente por ser nessa fase que as mudanças na composição ocorrem com maior intensidade. De acordo com Bron (2006), o amadurecimento é a fase que ocorre no final da maturação e início da senescência, composta por processos que determinam as características de qualidade, evidenciadas por mudanças na composição da polpa, principalmente, dada por várias transformações bioquímicas. Entre essas transformações destacam-se a mudança na coloração, devido à degradação das clorofilas e à síntese dos carotenoides (Jain et al., 2003), alteração do metabolismo dos carboidratos, amolecimento da polpa, modificação na textura e síntese de voláteis (Jain et al., 2003; Fonseca et al., 2007; Cara e Giovannoni, 2008; Bouzayen et al., 2009).

O amadurecimento do mamão é caracterizado por mudanças em seus constituintes, como o aumento no teor de ácidos orgânicos e vitamina C (Draetta et al., 1975; Roberts et al., 2008), degradação da clorofila e síntese de carotenoides (Birth et al., 1984; Yamanishi et al., 2005) e degradação da pectina levando à perda da firmeza (Lazan et al., 1989; Jacomino et al., 2003; Lopes et al., 2005; Shiga et al., 2009).

As mudanças de textura são atribuídas à atividade das enzimas que degradam a parede celular e não à degradação de amido, uma vez que já foi constatado que o fruto de mamão apresenta apenas traços deste constituinte durante seu desenvolvimento (Chan Jr. et al., 1979; Gomez et al., 1999). A pectinametilesterase (PME; EC 3.1.1.11) e a poligalacturonase (PG; EC 3.2.1.67) são algumas das enzimas que participam do processo de amaciamento da polpa do mamão (Lazan et al., 1995).

A enzima poligalacturonase tem maior afinidade pelo substrato linear, desmetilado, resultante da ação da pectinametilesterase. Portanto, a atividade da pectinametilesterase, responsável pela desmetilação do poliuronídeo, deve preceder a atividade da poligalacturonase (Paull et al., 1999). Manrique e Lajolo (2004) sugerem que a pectinametilesterase participa diretamente dos primeiros passos do processo de amolecimento dos frutos, desesterificando o polímero de ácido galacturônico (pectina), enquanto que a poligalacturonase catalisa a hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4 entre os resíduos de ácido galacturônico no interior da cadeia da pectina. D'Innocenzo (1996) quantificou as atividades da poligalacturonase e da pectinametilesterase em vários estádios de desenvolvimento dos frutos de mamão e concluiu que o amolecimento ocorria quando a atividade da pectinametilesterase era mínima e a da poligalacturonase era máxima.

Dada à alta perecibilidade do mamão, o controle do amadurecimento do fruto é fundamental para o aumento da sua vida-útil pós-colheita, visando os mercados interno e externo. Os principais fatores que depreciam a qualidade pós-colheita do mamão são o rápido amolecimento e a elevada incidência de podridões (Lazan et al., 1995; Jacomino et al., 2002).

### **2.2.3 Produção de etileno**

O amadurecimento do mamão está sensivelmente ligado à produção de etileno (Fabi et al., 2007). O etileno ( $C_2H_4$ ) é um hormônio gasoso vegetal que participa efetivamente da modulação dos processos que ocorrem durante o amadurecimento dos frutos climatéricos, resultando na redução do período de armazenamento desses frutos (Kays, 1994; Paull et al., 1997).

Estudos enfocando a ação do etileno apontam que não é somente a



presença do mesmo que desencadeia as respostas nos vegetais, mas também a sensibilidade dos tecidos ao hormônio, o que estaria diretamente ligado ao estágio de desenvolvimento do fruto (Corrêa et al., 2005).

Inicialmente, a participação do etileno nas transformações que resultam nas modificações de textura em frutos carnosos era atribuída apenas como um fator inicializador (Abeles et al., 1992). Atualmente tem sido demonstrado que o etileno também age como um fator envolvido na manutenção e regulação de uma série de transformações sensoriais nos frutos, como na firmeza, cor e sabor da polpa (Hiwasa et al., 2003; Fabi et al., 2007; Rossetto et al., 2008).

A produção de etileno pode ser aumentada por vários tipos de estresse, incluindo danos mecânicos, temperatura (resfriamento, congelamento e, ocasionalmente, alta temperatura) e produtos químicos (auxinas, herbicidas e vários poluentes) (Rossetto et al., 2008). O estresse provocado por altas temperaturas acelera o amadurecimento do fruto, induzindo outras mudanças fisiológicas, tais como o aumento na taxa de respiração e metabolismo de fenilpropanoides (Saltveit, 1999).

Frutos climatéricos como tomate, abacate e banana são distinguidos dos não climatéricos como morango, uvas e os citrus, não só pelo aumento na atividade respiratória, mas também pela produção de etileno durante o amadurecimento (Lelièvre et al., 1997). Nos climatéricos em especial, a presença do etileno estimula o amolecimento, havendo uma correlação direta entre o aumento na atividade das enzimas responsivas ao etileno e o amolecimento da polpa (Brummell e Harpster, 2001).

A via de biossíntese do etileno tem como precursor o aminoácido metionina e compreende a conversão da S-adenosil-metionina (SAM) em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), sob a ação da ACC sintetase (ACS) e a conversão do ACC em etileno, pela enzima formadora do etileno (EFE) ou ACC oxidase (ACO) (Taiz e Zeiger, 2010). Em alguns casos, o etileno regula sua própria síntese, a partir da indução de nova síntese de ACS e ACO. O ACC, precursor imediato do etileno, pode ser também convertido em malonil-ACC sob a ação da enzima N-maloniltransferase (NMT) e, então, transportado nessa forma para os vacúolos, regulando a síntese de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (Grierson, 1998; Taiz e Zeiger, 2010).

### 2.3. Conservação dos frutos - armazenamento refrigerado

O uso de refrigeração, quando bem aplicado, é um dos meios mais eficazes na manutenção da qualidade e extensão do período de comercialização dos produtos hortifrutícolas. A função do resfriamento é retardar os processos metabólicos, reduzindo a produção de etileno, porém sem ocasionar distúrbios fisiológicos, prolongando assim o tempo de comercialização (Chitarra e Chitarra, 2005). Com a redução da temperatura, as reações enzimáticas ligadas à respiração e senescência, ocorrem mais lentamente, minimizando a perda de qualidade dos frutos. Entretanto, a refrigeração deve diminuir o metabolismo do fruto sem, no entanto, alterar a fisiologia do amadurecimento a ponto de causar algum distúrbio (Zagory e Kader, 1989; Awad, 1993).

Por ser uma fruta tropical sensível ao frio, o mamão não tolera temperaturas de armazenamento muito baixas. A temperatura mínima para o armazenamento do mamão é determinada pela sua suscetibilidade à injúria ao frio. Temperaturas compreendidas entre 9 e 12 °C são geralmente as mais utilizadas para o seu armazenamento, dependendo de fatores como estágio de maturação, tipo de cultivar e condições ambientais de produção (Chen e Paull, 1986; Almeida et al., 2006).

Segundo Kader (2010), a respiração do mamão diminui significativamente quando o fruto é transferido da temperatura de 20°C para a temperatura de 10°C. A tolerância do mamão a temperaturas baixas varia com o estágio de desenvolvimento e o tempo de exposição do fruto. Chen e Paull (1986) observaram que mamões colhidos na maturidade fisiológica, apresentaram sintomas de danos por frio após duas semanas a 7°C, caracterizados pelo atraso e desuniformidade no amadurecimento, aumento na susceptibilidade a fungos e, em casos mais severos, escaldaduras na casca e falha de amadurecimento.

Como verificado, o emprego da refrigeração pode modificar a fisiologia do amadurecimento do mamão, contudo a conservação do fruto sob baixa temperatura pode estender a vida-útil destes enquanto o mesmo estiver sob baixa temperatura. Após a saída do fruto da condição de resfriamento, o que se observa é uma aceleração do processo de amadurecimento, ocorrendo transformações físico-químicas como a despigmentação verde da casca e a perda da firmeza da polpa (An e Paull, 1990). Tais transformações fazem com que os frutos percam, em pouco tempo, a qualidade para o consumo, dificultando a sua

comercialização, uma vez que se tornam mais susceptíveis a danos mecânicos, quando manipulados (Paull et al., 1997).

Segundo An e Paull (1990), a indução ao amadurecimento nos frutos de mamão armazenados a 10°C poderia estar relacionada a mudanças nos receptores de ligação do etileno durante o armazenamento, fazendo com que os frutos se tornem mais sensíveis a este hormônio.

Por outro lado, sabe-se que a baixa temperatura pode alterar o metabolismo respiratório em batata (Calegario et al., 2003; Pinheiro et al., 2004), *Vigna radiata* (González-Meler et al., 1999), maçã (Duque e Arrabaça, 1999) e tomate (Holtzapffel et al., 2002), pela dissipação do gradiente eletroquímico de prótons gerado na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons (CMTE). Tal efeito está relacionado à operação de “rotas alternativas” como a respiração resistente ao cianeto, pela atividade da oxidase alternativa (AOX) e à atuação da proteína desacopladora (UCP).

Trabalhos mostram que a AOX e a UCP, sob condições específicas, podem atuar no mesmo órgão (p.ex. o fruto), dependendo do estágio de desenvolvimento deste, com regulação e eficiência distintas (Calegario et al., 2003; Vercesi et al., 2006).

## **2.4. Mitocôndrias de plantas**

A mitocôndria é responsável por, aproximadamente, 90% da produção de energia celular, a qual ocorre por meio do processo de fosforilação oxidativa. Esta organela também é responsável pela maior parte da produção endógena de espécies reativas de oxigênio como biometabólitos, sendo considerada a reguladora central da apoptose celular (Copeland, 2002). A mesma participa, também, de forma moduladora no desenvolvimento em plantas, da produtividade, da fertilidade e da resistência à doença em plantas (Miller et al., 2007).

Em termos de estrutura e função, as mitocôndrias vegetais são significativamente similares às de outros organismos eucariotos. Tanto mitocôndrias de animais, quanto de vegetais possuem na membrana interna a cadeia transportadora de elétrons, bombeadora de prótons e produtora de ATP, além de fornecer um fluxo elevado de precursores metabólicos a partir do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Miller et al., 2007).

Entretanto, mitocôndrias de vegetais possuem além da NADH-UQ oxidoreductase (complexo I), que é bombeadora de prótons, quatro NAD(P)H desidrogenases (NAD(P)H-DH) não bombeadoras de prótons e insensíveis a rotenona. Destas, duas estão localizadas na face externa da membrana mitocondrial interna (NAD(P)H-DHext) e duas localizadas na face interna da membrana mitocondrial interna (NAD(P)H-DHint). Na membrana mitocondrial interna estão também presentes a AOX insensível ao cianeto e a UCP (Luethy et al., 1991; Moller, 2001).

As duas NAD(P)H-DHext são NADH e NADPH específicas e requerem a presença de  $\text{Ca}^{2+}$  para a atividade máxima. Acredita-se que o  $\text{Ca}^{2+}$  facilite a associação da NAD(P)H-DHext com a membrana mitocondrial e ainda regule a atividade da enzima (Rasmusson e Moller, 1991; Rasmusson et al., 2004). Contudo, somente a NADPH-DHint é dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  para a sua máxima atividade (Rasmusson e Moller, 1991). As NAD(P)H-DHext permitem que a mitocôndria vegetal utilize o NAD(P)H exógeno, transferindo elétrons para a ubiquinona, resultando na transferência de elétrons pela cadeia respiratória e na produção de ATP (Luethy et al., 1991).

A AOX é uma enzima que participa de outro mecanismo de dissipação de energia. Encontrada nas membranas internas das mitocôndrias vegetais, utiliza os elétrons provenientes da ubiquinona para reduzir o  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , impedindo a passagem desses pelos complexos III e IV (Moller, 2001). Inibida especificamente por alguns agentes complexantes de ferro, como o ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e o ácido benzohidroxâmico (BHAM), a sua atuação resulta na formação de um menor gradiente eletroquímico de prótons, com diminuição na produção de ATP e consequente liberação da energia sob a forma de calor (Vanlerberghe e MacIntosh, 1997).

A UCP foi descrita primeiramente por Vercesi et al. (1995) em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata e confirmada por clonagem do seu cDNA (Laloi et al., 1997). O aumento da síntese desta proteína tem sido relacionado ao envelhecimento e ao estresse pelo frio e segundo Moller (2001), funciona como proteção contra as espécies reativas de oxigênio, assim como a AOX e as NAD(P)H-DH alternativas.

### 2.4.1. Oxidase Alternativa

A respiração insensível ao cianeto foi observada primeiramente nas plantas em 1929 por Genevois em ervilha doce (Genevois, 1929). A maioria dos estudos realizados em plantas inteiras indicava a ocorrência da respiração resistente ao cianeto ligada à produção de calor (Lance, 1972; Meeuse, 1975). Quando as mitocôndrias isoladas foram usadas, os estudos eram centrados sobre a atividade relativa da rota insensível ao cianeto e do citocromo c oxidase, medindo taxas de respiração na presença de um inibidor de cada rota. Em 1978, uma oxidase foi solubilizada a partir de mitocôndrias de *Arum maculatum* (Huq e Palmer, 1978; Rich, 1978) e a respiração alternativa resistente ao cianeto foi atribuída a uma enzima a qual se chamou oxidase alternativa.

Após décadas de estudos, descobriu-se que a AOX catalisa a oxidação do ubiquinol e a redução do oxigênio a água, sem passar por dois sítios de conservação de energia em nível dos complexos III e IV. Portanto, não existe o reforço no gradiente eletroquímico de prótons ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) pelo transporte de elétrons entre a ubiquinona reduzida e o complexo IV (Vanlerberghe e McIntosh, 1997). A AOX é insensível ao cianeto, à antimicina A ou mixothiazol, mas é inibida por agentes complexantes de ferro, os ácidos hidroxâmicos como o ácido salicilhidroxâmico (SHAM), o ácido benzohidroxâmico (BHAM), o N-propilgalato e o tiocianato de potássio e estimulada por ácidos orgânicos como o piruvato (Millar et al., 2007).

A proteína AOX é expressa constitutivamente e o gene que a codifica possui regiões que são conservadas, sugerindo que essa via alternativa é uma rota importante no metabolismo das plantas (Vanlerberghe e McIntosh, 1997). Apesar da função dessa via não estar totalmente esclarecida, a termogênese tem sido relatada em Anonáceas, Araceae, Arecaceae, Aristolochiaceae, Cycadaceae, Nymphaeaceae, Winteraceae, Illiciaceae, Magnoliaceae, Rafflesiaceae e Nelumbonaceae, participando da liberação de voláteis atrativos para polinizadores e prevenção de danos ocasionados pela exposição à baixa temperatura (Elthon e McIntosh, 1986; Seymour, 2001; Watling et al., 2006; Grant et al., 2009).

Outras participações da AOX têm sido descritas na literatura, como a proteção contra o estresse oxidativo mitocondrial em tubérculos de batata armazenados à baixa temperatura (Calegario et al., 2003; Pinheiro et al., 2004), em feijão, *Vigna radiata*, (González-Meler et al., 1999), em células de tabaco

(Vanlerberghe e McIntosh, 1992), no amadurecimento de abacate (Solomos e Laties, 1974; Moreau e Romani, 1982; Ferguson et al., 1985), em banana (Kumar e Sinha, 1992), em manga (Kumar et al., 1990; Cruz-Hernández e Gómez-Lim, 1995) e no armazenamento de maçã sob baixa temperatura (Purvis, 1988; Duque e Arrabaça, 1999).

Segundo Pinheiro et al. (2004), a atividade da AOX em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata armazenados a baixas temperaturas por mais de 5 dias foi bastante elevada. Este mesmo efeito foi visualizado em frutos de maçã que, armazenados a 4°C, apresentaram aumento na respiração dos frutos e ativação da AOX causado pelo frio. Para Duque e Arrabaça (1999), a baixa temperatura altera o sincronismo entre a atividade glicolítica (produção de piruvato e NADH) e a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons (reoxidação de NADH), favorecendo ao acúmulo dos produtos da glicólise. Como consequência deste desequilíbrio haveria uma ativação das rotas alternativas, como forma de aumentar o fluxo de elétrons na CMTE (Vanlerberghe e McIntosh, 1997; Vercesi et al., 2006).

As proteínas AOX são classificadas em duas subfamílias, AOX1 e AOX2, codificadas por genes nucleares (Considine et al., 2002). Membros da família AOX1, presentes em mono e não monocotiledôneas são mais largamente estudados, sendo reguladas de maneira diferenciada em diferentes órgãos e estádios de desenvolvimento, além de responderem ao estresse. Já a AOX2, por outro lado, possui expressão gênica constitutiva e está presente somente em não monocotiledôneas (Considine et al., 2002). Essa distinção molecular sugere uma divergência entre as AOX nas famílias de plantas e pode ter implicações nas rotas fisiológicas nas diferentes espécies de plantas (Considine et al., 2002).

#### **2.4.2. Proteína desacopladora em plantas (UCP)**

A UCP está localizada na membrana mitocondrial interna e, pela dissipação do gradiente eletroquímico de prótons, desacopla a fosforilação oxidativa da síntese de ATP, produzindo apenas calor (Sweetlove et al., 2006).

A primeira UCP, conhecida como termogenina ou UCP1, foi descoberta na década de 70, por David Nicholls da Universidade de Dundee na Escócia (Nicholls e Akerman, 1982). A principal função até então conhecida era a produção de calor no tecido adiposo marrom, presente em recém-nascidos, ursos

e outros mamíferos (Ricquier e Kader, 1976). Contudo, apenas duas décadas depois, a UCP foi identificada e isolada de tubérculos de batata (Vercesi et al., 1995) e tomate (Jezek et al., 1996) utilizando métodos que foram aplicados para mitocôndrias de tecido adiposo marrom.

Segundo Vercesi et al. (2006), a UCP é uma proteína integral de membrana com cerca de 300 aminoácidos e com massa molecular aparente de 30 a 33 kDa. A ativação da UCP é feita por ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido linolênico, ácido oléico, ácido palmítico, ácido mirístico e ácido láurico, podendo ainda ser inibida por BSA, ATP, GTP, GDP e ADP (Jezek et al., 1996; Jezek et al., 1998; Vercesi et al., 1998).

Em estudos realizados com mitocôndrias de tubérculos de batata, a UCP foi ativada pela adição de ácido linoléico, levando a uma diminuição da produção de espécies reativas de O<sub>2</sub> (EROs) nessas mitocôndrias. Por outro lado, quando a UCP foi inibida, ocorreu um aumento na produção do peróxido de hidrogênio (Kowaltowski et al., 1998). Em tomate, o ácido linoléico também aumentou a atividade de UCP (Almeida et al., 2002). Coerentemente, a ativação da UCP em tubérculos de alcachofra de Jerusalém, por ácidos graxos, está relacionada com a diminuição de EROs e com a diminuição da produção de ânions superóxidos (Paventi et al., 2006).

Entre as funções fisiológicas da UCP está uma possível ação termogênica (Ito-Inaba et al., 2008), além da participação na regulação da geração de EROs, resposta a situações de estresse, como a baixa temperatura, a seca, dano por ferimento e ataque de patógenos (Moller, 2001; Pinheiro et al., 2004; Vercesi et al., 2006) e regulação do metabolismo energético (Sluse e Jarmuszkiewicz, 2000).

Trabalhos relatados na literatura têm sugerido que a atividade da UCP é fortemente aumentada ao longo dos estádios de desenvolvimento de frutos de manga (Considine et al., 2001) e tomate (Holtzapffel et al., 2002). Em mitocôndrias de tubérculos de batata que sofreram estresse pelo frio, houve um aumento da expressão da UCP com a consequente estimulação da respiração (Calegario et al., 2003). Laloi et al. (1997) verificaram que em mitocôndrias de folhas de batata a UCP teve sua expressão aumentada com o estresse pelo frio. Deste modo, a função da UCP em cada um desses casos está relacionada à capacidade desacopladora e ao metabolismo específico de cada tecido (Vercesi et al., 2006).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

O trabalho visa investigar se as condições de armazenamento do mamão podem induzir a atividade da oxidase alternativa e da proteína desacopladora da respiração mitocondrial, promovendo uma aceleração do processo respiratório e contribuindo, dessa forma, para a redução na vida-útil destes frutos.

#### **3.2. Objetivos específicos**

a) Fornecer subsídios ao entendimento dos processos bioquímicos e fisiológicos da atividade respiratória em frutos de mamoeiro armazenados sob condições controladas;

b) Determinar a velocidade do consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas utilizando malato e glutamato como substratos oxidáveis;

c) Verificar se há atividade da AOX e da UCP em frutos de mamoeiro armazenados à temperatura ambiente (25°C) e sob baixa temperatura (12°C);

d) Investigar o efeito das condições de armazenamento sobre a emissão de gases (CO<sub>2</sub> e C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) em frutos de mamão;

e) Associar as determinações da atividade respiratória em frutos intactos com procedimentos para estudo do metabolismo respiratório em mitocôndrias isoladas.



## **4. TRABALHOS**

### **4.1. Respiração resistente ao cianeto, à proteína desacopladora mitocondrial e à emissão de etileno durante o amadurecimento do mamão armazenado à temperatura ambiente.**

#### **4.1.1 Resumo**

Com o objetivo de verificar mudanças no metabolismo mitocondrial, principalmente no que se refere à atividade da oxidase alternativa (AOX) e da proteína desacopladora (UCP) de mitocôndrias durante o amadurecimento pós-colheita, frutos de mamão 'Golden' no estágio 0 de maturação (verde - fruto desenvolvido com casca 100% verde) foram armazenados, por até nove dias, em câmaras com controle de temperatura ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e de umidade relativa ( $80\% \pm 5\%$ ). Diariamente foram avaliados: a taxa de emissão de etileno e de  $\text{CO}_2$  de frutos intactos; a coloração da casca, a firmeza da polpa e o teor de sólidos solúveis para caracterizar a evolução do amadurecimento dos frutos. Em cada período de amostragem também foi avaliada a atividade respiratória em mitocôndrias isoladas, usando um eletrodo de oxigênio tipo Clark, tendo malato e

glutamato como substratos oxidáveis. Utilizando meio de reação com BSA para inibir a atividade da UCP, acrescido de DTT e piruvato para estimular a AOX, a respiração resistente ao cianeto foi avaliada pelo consumo de O<sub>2</sub>. Para avaliar a atividade da UCP, o meio de reação foi suplementado com propranolol para inibir o canal aniônico, além de N-propilgalato e atractilosídeo para eliminar as interferências da AOX e da ATP-sintase, respectivamente. Foi possível observar aumento da velocidade respiratória e desacoplamento na presença de ácido linoléico, um indutor da atividade da UCP. Com a evolução no amadurecimento dos frutos de mamão houve aumento na atividade das proteínas AOX e UCP em mitocôndrias isoladas, com aceleração da atividade respiratória. Isso indica que estes sistemas de dissipação de energia devem apresentar importante função durante o processo de amadurecimento dos frutos de mamão. A maior participação da AOX ocorreu no final do amadurecimento, em estreita relação com o aumento da taxa respiratória, enquanto a atividade da UCP foi maior aos cinco dias de armazenamento dos frutos, indicando maior proximidade com o padrão de resposta verificado para a emissão de etileno.

#### **4.1. Cyanide-resistant respiration, mitochondrial uncoupling protein activity and ethylene emission during papaya ripening stored at controlled temperature**

##### **4.1.2. ABSTRACT**

In order to verify changes in mitochondrial metabolism, especially as regards the activity of alternative oxidase (AOX) and uncoupling protein (UCP) in mitochondria during ripening after harvest, fruits of 'Golden' papaya ripening stage 0 (green - fruit peel developed with 100% green) were stored for up to nine days in chambers

with controlled temperature ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) and humidity ( $80\% \pm 5\%$ ). Daily were evaluated: the rate of emission of ethylene and  $\text{CO}_2$  intact fruit, the peel color, flesh firmness and soluble solids to characterize the evolution of fruit ripening. In each sampling period was also assessed respiratory activity in isolated mitochondria using a Clark-type oxygen electrode, with glutamate and malate as oxidizable substrates. Using the reaction medium with BSA to inhibit the activity of UCP, plus DTT and pyruvate to stimulate AOX, cyanide-resistant respiration was assessed by  $\text{O}_2$  consumption. To assess the activity of the CPU, the reaction medium was supplemented with propranolol to inhibit anion channel, and N-propyl gallate and Atractyloside to eliminate interference of AOX and ATP synthase, respectively. It was observed increase in respiratory rate and uncoupling in the presence of linoleic acid, an inducer of CPU activity. With the evolution in ripening of papaya was no increase in the activity of proteins AOX and UCP in isolated mitochondria, with accelerated respiration. This indicates that these systems of energy dissipation must have an important role during the ripening of papaya. The increased participation of AOX occurred at the end of ripening, in close relation with increased respiratory rate, while the activity of UCP was increased to five days storage of fruits, indicating a greater proximity to the response pattern observed for the emission of ethylene .

#### **4.1.3. Introdução**

Os frutos de mamão se caracterizam por apresentar uma vida pós-colheita relativamente curta e o prolongamento do tempo de prateleira destes frutos é um fator de importância econômica para a sua comercialização, principalmente, no mercado externo. Sendo um fruto climatérico, o mamão apresenta um surto respiratório bastante elevado durante a fase de amadurecimento, com consequências diretas na vida pós-colheita do fruto (Jones and Kubota, 1940; Azevedo et al., 2008; Pereira et al., 2009; Corrêa et al., 2011). Vários estudos têm sido feitos para ampliar o conhecimento dos processos bioquímicos envolvidos no

desenvolvimento de frutos, com o objetivo de elucidar fatores passíveis de manipulação, controle ou interferência e possibilitar modificações que permitam estender a vida útil destes frutos (Azevedo et al., 2008; Souza et al., 2009).

O amadurecimento é uma fase de desenvolvimento dos frutos, desencadeada por alterações no equilíbrio hormonal, relacionadas com a programação das células para responder a tais mudanças. Os processos relacionados às mudanças na textura da polpa, na coloração da polpa e da casca, o aumento no teor dos sólidos solúveis e o aumento na taxa respiratória durante o amadurecimento dos frutos são atribuídos à ação do etileno (Abeles et al., 1992; Hiwasa et al., 2003; Krongyut et al., 2011). Iniciada a fase de amadurecimento, tais transformações ocorrem muito rapidamente fazendo com que o fruto atinja a máxima qualidade para o consumo, seguindo-se a fase de senescência, que culminará na completa decomposição do fruto.

A intensidade da atividade respiratória está diretamente ligada à conservação dos frutos. Quanto maior a atividade respiratória, menor a vida útil destes. Portanto, qualquer estratégia para retardar a senescência e assim a perda de qualidade do fruto para o consumo, deve atuar sobre a sua respiração.

Diversos estudos na literatura têm demonstrado que as condições de armazenamento de diferentes tecidos das plantas podem alterar o seu metabolismo respiratório, principalmente, pela dissipação do gradiente eletroquímico de prótons. Alguns destes estudos têm associado as alterações na atividade respiratória à operação de rotas mitocondriais alternativas, como a respiração resistente ao cianeto e a atuação da proteína desacopladora, em frutos de maçã (Duque e Arrabaça, 1999), em sementes de feijão e soja (González-Meler et al., 1999) e em tubérculos de batata (Calegario et al., 2003; Pinheiro et al., 2004).

Outros relatos da literatura demonstram também que alguns genes que codificam para UCP são regulados temporalmente, especialmente durante o estágio de maturação de frutos. Uma expressão fortemente aumentada desses genes foi observada em manga em estágio de senescência (Considine et al., 2001) e nos estádios tardios da maturação de tomate mantidos na própria planta (Holtzapffel et al., 2002). Estes dados corroboram com a observação de maior acoplamento encontrado em mitocôndrias isoladas de tomates verdes, quando comparado com mitocôndrias obtidas de tomates maduros (Costa et al., 1999),

sugerindo uma maior participação da UCP nos estádios de maturação mais avançados em frutos climatéricos.

Vários estudos com o papaya têm fornecido informações sobre eventos bioquímicos e fisiológicos (Azevedo et al., 2008; Pereira et al., 2009; Bron e Jacomino, 2009; Souza et al., 2009; Godoy et al., 2010; Jacomino et al., 2010; Tezotto et al., 2011) que ocorrem durante o amadurecimento do fruto, associados com as mudanças na emissão de etileno e na taxa respiratória. Porém, há uma carência de informações na literatura a respeito da atividade respiratória em mitocôndrias isoladas do fruto do mamoeiro e a participação das rotas alternativas durante o amadurecimento do fruto. Estas informações poderão contribuir para melhor compreensão do metabolismo respiratório dos frutos climatéricos e podem ser úteis nas estratégias de manejo pós-colheita destes produtos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação da via resistente ao cianeto e da proteína desacopladora na atividade respiratória de mitocôndrias isoladas da polpa de mamão, durante o amadurecimento dos frutos.

#### **4.1.4. Material e Métodos**

##### **4.1.4.1. Material vegetal e condições de armazenamento**

Foram utilizados frutos de mamão 'Golden', procedentes de pomar comercial da empresa Caliman Agrícola S/A, localizado em 19°15'S e 39°51'70" W, na cidade de Linhares – ES. Os frutos foram colhidos e após lavagem e seleção no packing house transportados para o Setor de Fisiologia Vegetal do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da UENF, em Campos dos Goytacazes (RJ), a cerca de seis horas do local da colheita. Os frutos no estágio 0 de maturação (fruto desenvolvido com casca 100% verde) foram armazenados por até nove dias em câmaras com controle de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e umidade relativa ( $85\% \pm 5\%$ ). Os frutos foram amostrados diariamente, com três

repetições, abrangendo oito estádios de desenvolvimento (E0; E1; E2; E3; E4; E5; E6; E9) conforme figura 1. A evolução do amadurecimento do fruto foi caracterizada pela análise dos atributos físico-químicos e pela emissão dos gases CO<sub>2</sub> e etileno, conforme descrito a seguir.

#### 4.1.4.2. Avaliação dos atributos físico-químicos

As medições da coloração da casca do fruto foram realizadas utilizando um colorímetro portátil (Chroma Meter, modelo CR-300, Minolta, Japão), registrando-se as variáveis de cor dentro do espaço CIELAB:  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e o ângulo de cor *hue* (McGuire, 1992). A firmeza da polpa foi obtida por meio da resistência à penetração, utilizando-se um penetrômetro digital de bancada (Fruit Pressure Tester, modelo 53205, TR, Itália), com corpo de prova de 8 mm. O teor de sólidos solúveis (SS) foi determinado utilizando-se um refratômetro portátil (Atago N1, França) e os resultados expressos em °Brix.

#### 4.1.4.3. Avaliação da emissão dos gases CO<sub>2</sub> e etileno

Para a quantificação da produção dos gases CO<sub>2</sub> e C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> foi utilizado um espectrômetro fotoacústico, acoplado a um analisador de gás no infravermelho. Neste sistema as mudanças de pressão são detectadas por um microfone colocado no interior de um tubo ressonador da célula fotoacústica, através do qual flui a amostra gasosa contendo as moléculas sob investigação. O sinal acústico é produzido pela flutuação periódica de pressão dentro da célula fotoacústica (Corrêa et al., 2011).

Individualmente os frutos foram colocados dentro de uma câmara (porta amostra) de cerca de 1,0 L, com o ar ambiente sendo utilizado como gás de arraste a partir do monitoramento por controladores eletrônicos.

Este fluxo passa pelo analisador de gás no infravermelho - URAS, para medição do conteúdo de CO<sub>2</sub> e, posteriormente, por filtros contendo KOH e CaCl<sub>2</sub> para eliminar CO<sub>2</sub> e água, respectivamente, no gás analisado. Antes do gás entrar na célula fotoacústica o mesmo passa através de uma armadilha de N<sub>2</sub> líquido, evitando-se assim a interferência de traços de gases. Após a passagem pela

célula fotoacústica o fluxo é lançado para o ambiente. Por meio dessa montagem experimental é possível monitorar simultaneamente a produção de etileno e de CO<sub>2</sub> em frutos intactos na ordem de partes por bilhão (ppb), apresentando a vantagem de medir os gases em tempo real, não havendo a necessidade de acúmulo do gás. (Corrêa et al., 2005; Silva et al., 2005; Azevedo et al., 2008; Pereira et al., 2009; Corrêa et al., 2011).

#### 4.1.4.4. Isolamentos das mitocôndrias

As mitocôndrias foram isoladas a 4°C, utilizando-se cerca de 300g da polpa dos mesmos frutos utilizados para as análises físico-químicas. O tecido foi homogeneizado em centrífuga (Juicer, modelo R16720, Walita, Brasil) em cerca de 1,0 L de tampão de isolamento [manitol 0,35 M, MOPS 50 mM, EDTA 3 mM, Cys 8 mM, BSA 0,1% (p/v), PVP-25 0,4% (p/v), pH 7,4] sob agitação constante. O homogenato foi filtrado através de quatro camadas de gaze e uma de Miracloth (Calbiochem, CA, USA) e centrifugado a 1.500 g, por 15 min. O sobrenadante foi centrifugado a 15.000 g, por 15 min, sendo o *pellet* ressuspensionado em tampão de lavagem [manitol 0,35 M, MOPS 10 mM, EDTA 0.5 mM, BSA 0,1% (p/v), pH 7,2]. Esta suspensão foi centrifugada a 1.000 g por 8 min, sendo o sobrenadante novamente centrifugado a 9.000 g, por 15 min para obtenção das mitocôndrias no precipitado.

Para a purificação das mitocôndrias foi utilizado um gradiente em *percoll*. O precipitado coletado foi suspenso em 1 a 2 mL do tampão de lavagem e vertido sobre 30 mL de tampão de purificação [*percoll* 22,5 % (v/v), manitol 0,6 M, MOPS 10 mM, BSA 0,5% (p/v), pH 7,2] sendo centrifugado a 12.000 g por 45 min. As mitocôndrias purificadas foram coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur, na região basal dos tubos, sendo diluídas aproximadamente dez vezes com tampão de lavagem e centrifugadas a 10.000 g por 15 min. O procedimento seguiu o protocolo proposto por Duque e Arrabaça (1999), com modificações.

A concentração de proteínas foi determinada espectrofotometricamente, a 595 nm como descrito por Bradford (1976), utilizando BSA como proteína padrão.

#### 4.1.4.4.1. Atividade respiratória

Foi utilizado 1 mg de proteína para determinação da atividade respiratória das mitocôndrias isoladas, pelo método poralográfico, usando um eletrodo de O<sub>2</sub> tipo Clark (Hansatech, Respire 1, UK) em 1,0 mL de meio de reação [manitol 0,35 M, tampão fosfato 10 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, BSA 0,5% (p/v), pH 7,2] à temperatura de 25°C. Todo o ensaio foi realizado na presença de ATP 200 µM, além de malato 10 mM e glutamato 20 mM como substratos oxidáveis. Após a adição de 100 nmoles de ADP ao meio de reação foram registrados os estados 3 e 4 da respiração, evidenciando a capacidade fosforilativa das mitocôndrias. Os controles respiratórios calculados para as adições de 100 nmoles de ADP variaram de 6,0 (nas amostras preparadas com frutos no estádio E0) a 2,6 (nas amostras preparadas com frutos no estádio E9), considerados bons índices para mitocôndrias vegetais (Duque e Arrabaça, 1999; Pinheiro et al., 2004; Mariano et al., 2008), indicativos de boas preparações mitocondriais.

A avaliação da via respiratória resistente ao cianeto foi obtida através da atividade da AOX a partir da medição da taxa de consumo de O<sub>2</sub> na presença de KCN 3 mM, em mitocôndrias no estado 4 (Duque e Arrabaça, 1999).

A capacidade da AOX foi avaliada utilizando o meio de reação descrito acima, suplementado com 2,5 µg de oligomicina e 300 µM de propranolol para inibir a ATP-sintase e o canal aniônico, respectivamente (Beavis e Vercesi, 1992; Martins et al., 1993; Calegario et al., 2003), além de adições de 1 mM de ditiotreitól (DTT) e 0,15 mM de piruvato para ativar a AOX (Wagner et al., 1995) e BSA 0,5% (p/v) para inibir a atividade da UCP. A inibição da citocromo c oxidase se deu a partir da adição de 3 mM de KCN ao meio de reação, enquanto a adição de 20 µM de *n*-propilgalato (PG) visou a inibição da AOX.

Obtidos os traçados e calculadas as taxas de consumo de O<sub>2</sub> das mitocôndrias isoladas, foram calculados os percentuais da respiração total e da respiração resistente ao cianeto para efeito de comparação entre as vias de consumo de O<sub>2</sub>.

A capacidade funcional da UCP foi medida usando-se 5 mg de proteína mitocondrial em 1,0 mL de meio de reação sem BSA, suplementado com 300 µM de propranolol e 20 µM de PG, pelas mesmas razões descritas anteriormente. A este meio de reação foram adicionados 2,5 µg de oligomicina e 20 µM de atractilosídeo, bloqueadores da ATP-sintase e do transportador de ADP/ATP,



respectivamente, além de 10 $\mu$ M de ácido linoléico (LA), para promover a atividade da UCP (Mariano et al., 2008). Para inibir a atividade UCP foram adicionados BSA 0,5% (p/v) e 1 mM de ATP. Finalmente, para promover o completo desacoplamento das mitocôndrias foi adicionado 5  $\mu$ M de CCCP ao meio de reação (Almeida et al., 1999).

A capacidade funcional da UCP foi obtida pela diferença entre o consumo de O<sub>2</sub> pelas mitocôndrias após indução da atividade UCP (registrado a partir da adição de LA ao meio) e a respiração após a inibição da UCP pela adição de BSA e ATP, isto é: declividade **(2)** – declividade **(3)** na Figura 5.

Os resultados apresentados são valores médios de três diferentes preparações mitocondriais obtidas a partir de polpa de mamão armazenados a 25 °C, por até nove dias.

#### **4.1.4.5. Avaliação do potencial elétrico de membrana**

O potencial elétrico de membrana ( $\Delta\Psi$ ) foi determinado utilizando um eletrodo de cloreto de tetrafenilfosfônio (TPP<sup>+</sup>), construído no Setor de Fisiologia Vegetal do LMGV/UENF, de acordo com Kamo et al. (1979). Para as avaliações foram utilizadas 5 mg de proteína mitocondrial em 1,0 mL de meio de reação sem BSA, suplementado com 2,5  $\mu$ g de oligomicina, 300  $\mu$ M de propranolol, 20  $\mu$ M de atractilosídeo e 20  $\mu$ M de *n*-propilgalato. Durante o registro do potencial de membrana foram adicionados ao meio de reação 10  $\mu$ M de LA para induzir a atividade da UCP, seguido de BSA 0,5% (p/v) e 1 mM de ATP para inibir a atividade da UCP, além de 5  $\mu$ M de CCCP para promover o completo desacoplamento mitocondrial.

#### **4.1.4.6. Análises estatísticas**

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey para a comparação das médias. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados em nível de significância  $p < 0,05$ .

#### 4.1.5. Resultados e discussão

Neste trabalho, frutos do mamoeiro foram armazenados em condições controladas de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e umidade relativa ( $85\% \pm 5\%$ ), sendo acompanhada a evolução do amadurecimento dos frutos. Para tanto, foram realizados o monitoramento da taxa de emissão de etileno e de  $\text{CO}_2$  de frutos intactos e a avaliação dos atributos físico-químicos dos frutos. Também foram feitos ensaios para avaliação da atividade respiratória em mitocôndrias isoladas da polpa dos frutos, mais precisamente no que se refere à atividade da via alternativa da CMTE envolvendo a participação da proteína AOX, além da UCP.

A evolução do amadurecimento do mamão foi acompanhada pela análise dos parâmetros de cor  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e ângulo *hue*, firmeza da polpa e teor SS, no período de nove dias, como apresentado na Tabela 1. Os dados mostram uma diminuição do ângulo *hue* de  $117^{\circ}$  para  $78^{\circ}$ , entre o início e o final do período de avaliação, mostrando a evolução da cor da casca do verde para o amarelo, o que também pode ser evidenciado na Figura 1. A evolução da cor da casca também pode ser observada na Tabela 1 pela tendência de aumento dos valores dos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$ , que refletem, respectivamente, a perda da coloração verde e o amarelecimento da casca durante o amadurecimento do mamão. Durante o amadurecimento dos frutos a média dos valores de  $L^*$  foi superior a 50, o que corresponde a cores claras (Tabela 1). Esses dados estão próximos àqueles mencionados na literatura, confirmando a variação de tonalidade da casca do mamão do verde para o amarelo brilhante, durante o amadurecimento do fruto (Oliveira et al., 2002; Azevedo et al., 2008; Pereira et al., 2009; Souza et al., 2009).



Figura 1. Imagens fotográficas das alterações visuais durante o amadurecimento de frutos de mamão 'Golden' ao longo de seu armazenamento por nove dias. E0 = fruto no dia da colheita no estágio zero de maturação; os números indicam o número de dias de armazenamento após a colheita.

Tabela 1: Parâmetros de cor  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e ângulo  $hue$  ( $h^\circ$ ), firmeza da polpa (N) e teor de SS ( $^\circ$ Brix) em frutos de mamão 'Golden' armazenados a  $25^\circ\text{C}$ , por até nove dias.

Tempo de armazenamento (dias)	Parâmetros de cor				Firmeza da polpa (N)	SS ( $^\circ$ Brix)
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	Ângulo $hue$ ( $h^\circ$ )		
0	63,5 ab**	-22,7 d	43,4 bc	117,7 a	94,1 a	9,1 a
1	53,5 b	-18,8 d	38,6 c	115,9 a	102,7 a	9,4 a
2	55,5 b	-20,3 d	40,3 c	116,7 a	90,8 a	9,1 a
3	58,2 b	-17,2 cd	44,3 bc	111,6 b	72,0 a	9,8 a
4	63,4 ab	-16,9 cd	46,3 bc	110,0 b	73,5 a	9,8 a
5	70,7 ab	-11,5 c	55,4 abc	101,7 c	8,1 b	9,8 a
6	70,4 ab	-4,9 b	62,0 ab	94,0 d	3,7 b	10,0 a
9	84,8 a	15,9 a	74,2 a	78,4 e	1,1 b	9,6 a

\*\* Médias seguidas pelas mesmas letras, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A mudança na coloração da casca do fruto, do verde para o amarelo, é um evento típico que ocorre durante a fase de amadurecimento do fruto do mamão (Figura 1). Alterações na pigmentação da casca durante essa fase envolvem, entre outros, a degradação das clorofilas e a biossíntese de carotenoides (Wills e

Widjanarko, 1995). Os resultados mostram, também, uma tendência de aumento na luminosidade da casca, verificado a partir do índice  $L^*$  (Tabela 1).

A perda da firmeza da polpa do mamão, aliada à mudança da coloração da casca, são as transformações mais características que ocorrem durante o amadurecimento do fruto, sendo estes importantes atributos de qualidade para a comercialização do mesmo (Lazan et al., 1989; Pereira et al., 2009). Na Tabela 1 observa-se um decréscimo na firmeza da polpa do mamão de 102,7 N, no primeiro dia, para 1,0 N no nono dia de armazenamento dos frutos.

O amolecimento da polpa do mamão na fase de amadurecimento envolve uma série de reações enzimáticas. Estas reações são desencadeadas pelo aumento da respiração e, principalmente, a produção de etileno, que modula a atividade das enzimas hidrolíticas que atuam na degradação de componentes de parede celular. São conhecidas as enzimas de degradação da parede celular em mamão: celulase (EC 3.2.1.4), pectinametilesterase (PME, EC 3.2.1.11), endopoligalacturonase (endoPG, EC 3.2.1.15), endoglucanase (EGase, EC 3.2.1.4),  $\beta$ -xilosidase (EC 3.2.1.37),  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal, EC 3.2.1.23) e endo-1,4- $\beta$ -xilânase (EC 3.2.1.8) (Paull e Chen, 1983; Paull et al., 1999; Chen e Paull, 2003; Lazan et al., 2004; Fontes et al., 2008; Thumdee et al., 2010; Oliveira e Vitoria, 2011).

O teor de SS não apresentou alteração significativa durante o período de armazenamento, oscilando entre 9,1 °Brix a 10,0 °Brix. Estes resultados são semelhantes àqueles observados por Azevedo et al. (2008), que verificaram também pouca variação neste atributo durante o amadurecimento do mamão. Apesar de Coultate (2004) afirmar que o teor de SS é um bom parâmetro utilizado na avaliação da qualidade de um fruto, em mamão frequentemente observa-se muito pouca variação desse atributo após a colheita do fruto (Azevedo et al., 2008; Pereira et al., 2009; Souza et al., 2009). Atribui-se esta pequena variação no teor de SS na pós-colheita do mamão à baixa quantidade de amido encontrada na polpa destes frutos (Balbino, 2003). Gomez et al. (2002) estudaram a evolução dos açúcares solúveis e a sua relação com a doçura durante o amadurecimento do mamão e confirmaram que esse fruto não tem amido suficiente para ser hidrolisado para a produção da doçura na polpa. Ainda segundo esses autores, a fonte de carbono para a síntese de sacarose durante o amadurecimento do

mamão é de origem estrutural, com liberação de galactose, cujos níveis observados na parede celular diminuem durante o amadurecimento.

O acompanhamento da taxa de emissão de etileno durante o amadurecimento do fruto é essencial para a definição do climatério (Saltveit, 1999). Na Figura 2 é possível observar um aumento na taxa de emissão de etileno a partir do segundo dia de armazenamento, com registro do pico no quinto dia, a partir do qual se observou rápida queda. A acurácia na determinação do pico climatério é garantida pela alta sensibilidade do espectrômetro fotoacústico empregado para a determinação da emissão de gases durante o amadurecimento do mamão (Silva et al., 2005; Corrêa et al., 2011).

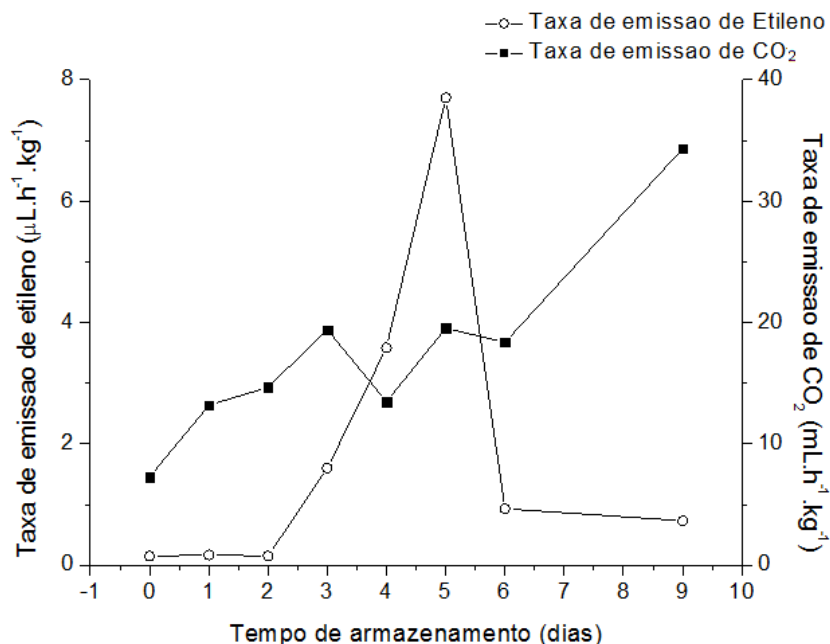


Figura 2. Taxas respiratórias e de emissão de etileno em frutos de mamão 'Golden', armazenados a 25°C, ao longo de nove dias de armazenamento.

A taxa de emissão de etileno foi de  $0,14 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$  no início do armazenamento dos frutos e de  $7,8 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$  no quinto dia, quando foi registrado o pico climatério. A ocorrência do climatério coincide com as transformações mais marcantes observadas nos atributos físico-químicos do mamão, como o amarelecimento da casca (ângulo *hue* próximo de  $90^\circ$ ) e a perda de firmeza da polpa, bastante significativa entre o quarto e o quinto dia (Tabela 1). A proximidade entre a ocorrência do pico climatério e as mudanças em alguns

atributos físico-químicos durante o amadurecimento do mamão já foi relatada na literatura (Azevedo et al., 2008; Souza et al., 2009).

Enquanto a emissão de etileno apresentou um pico característico, a respiração não apresentou similaridade na emissão de CO<sub>2</sub>. O que se observa é uma tendência crescente na taxa de emissão de CO<sub>2</sub> pelos frutos durante seu armazenamento (Figura 2). A taxa respiratória dos frutos variou de 7,25 mL.h<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup> a 34,32 mL.h<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup> entre o início e o final do amadurecimento dos frutos de mamão.

A relação de causa e efeito entre a produção de etileno e a respiração não está bem definida na literatura, sendo ainda controversas as opiniões sobre qual processo modula ou sofre modulação um do outro. Segundo Chitarra e Chitarra (2005), o aumento da taxa respiratória é um evento secundário e dependente dos níveis disponíveis de etileno. Por outro lado, Romani (1984) afirma que o climatério seria a resposta homeostática máxima das mitocôndrias para compensar os efeitos degradantes da senescência celular, sendo o aumento na produção de etileno, também, uma resposta a esse estresse. As afirmações de Romani (1984) foram baseadas em experimentos que comprovam que a energia gerada pelo metabolismo basal já seria suficiente para as transformações bioquímicas durante o amadurecimento (Solomos, 1977) e que algumas destas transformações ocorrem sem qualquer aumento na respiração (Romani et al., 1983). Trabalhando com mamão, Selvaraj e Pal (1982) registraram a atividade crescente da respiração, com ocorrência de um pico, durante o amadurecimento do fruto, embora não tenham observado nenhuma mudança expressiva na firmeza da polpa e desverdecimento da casca após o climatério.

Neste trabalho observam-se mudanças, principalmente, na coloração da casca e na firmeza da polpa (Tabela 1) coincidentes com o pico de emissão de etileno, sem que a respiração apresentasse o padrão climatérico típico. A máxima taxa respiratória foi registrada no final do armazenamento dos frutos, quatro dias após o pico na produção de etileno (Figura 1), quando as principais transformações nos atributos físico-químicos já haviam ocorrido. Estes resultados sugerem que a ausência de um pico na respiração talvez esteja ligada à capacidade homeostática mitocondrial e que os níveis de etileno observados e a atividade respiratória, já seriam suficientes para estimular as transformações bioquímicas (Romani, 1984). Apesar de não ter sido verificado o climatério

respiratório neste trabalho, outros trabalhos na literatura, em alguns casos utilizando a mesma metodologia de detecção de gases utilizada aqui, identificaram um pico respiratório durante o amadurecimento de frutos de mamão, podendo este ser coincidente (Correia et al., 2011), anterior (Silva et al., 2003) ou posterior (Jacomino et al., 2002) à máxima emissão de etileno.

O isolamento e a purificação das mitocôndrias em *percoll*, na presença de BSA, permitiu a obtenção de mitocôndrias acopladas, com bons valores de controle respiratório, durante todo o tempo de armazenamento dos frutos. A Tabela 2 mostra as taxas de consumo de O<sub>2</sub> e o CR das mitocôndrias isoladas da polpa do mamão, ao longo do período de armazenamento.

O consumo de O<sub>2</sub> no estado 3 refere-se à respiração acelerada na presença de ADP e a respiração consecutiva, a partir do término da fosforilação do ADP, refere-se ao estado 4. O controle de ADP sobre o consumo de O<sub>2</sub> é indicativo do grau de acoplamento da fosforilação oxidativa e é caracterizado pela razão entre a velocidade de respiração no estado 3 e no estado 4. Os valores do CR variaram de 6,0 a 2,6, indicando que as preparações estavam boas, com bom nível de acoplamento das mitocôndrias na oxidação do malato e do glutamato (Duque e Arrabaça, 1999; Mariano et al., 2004; Pinheiro et al., 2004; Mariano et al., 2008). Os dados mostram que, com o amadurecimento do mamão, houve uma tendência de redução no nível de acoplamento das mitocôndrias, verificado pela redução no CR (Tabela 2). É provável que essa tendência esteja relacionada à ativação de rotas alternativas na CMTE (Mariano et al., 2004; 2008).

Tabela 2. Taxa de consumo de O<sub>2</sub> nos estados 3 e 4 e controle respiratório (CR) de mitocôndrias isoladas de polpa de frutos de mamão 'Golden' armazenados a 25 ° C, por até nove dias. Os dados se referem às médias ± desvio padrão, de três diferentes preparações mitocondriais.

Tempo de armazenamento (dias)	Taxa de consumo de O <sub>2</sub> (nmol O <sub>2</sub> .min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )		CR
	Estado 3	Estado 4	
0	109,0 ± 2,0	18,1 ± 2,0	6,0 ± 2,0
1	83,6 ± 6,0	15,7 ± 4,0	5,2 ± 0,4
2	106,6 ± 5,0	33,9 ± 2,0	3,1 ± 0,9
3	120,0 ± 7,0	31,5 ± 4,0	3,9 ± 0,8
4	117,7 ± 10,0	35,1 ± 9,0	3,8 ± 1,4
5	126,6 ± 4,0	47,2 ± 6,0	2,8 ± 0,8
6	140,6 ± 6,0	53,3 ± 9,0	2,6 ± 0,2
9	204,8 ± 10,0	81,2 ± 10,0	2,6 ± 0,4

No início do armazenamento a taxa respiratória das mitocôndrias no estado 3 foi de 109,09 nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> e no estado 4 de 18,18 nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>. A tendência observada durante o armazenamento dos frutos foi de aumento na taxa de consumo de O<sub>2</sub> das mitocôndrias, tanto na respiração sustentada pela síntese de ATP (estado 3), quanto na respiração de repouso (estado 4) (Tabela 2). Este padrão confirma a tendência observada para a taxa respiratória do fruto intacto (Figura 2), onde a atividade respiratória máxima foi verificada no nono dia de armazenamento dos frutos.

O desacoplamento das mitocôndrias resulta em menor resistência ao fluxo de elétrons na CMTE, devido à redução no potencial de membrana (Vercesi, 2001; Kadenbach et al., 2010), levando a um aumento na oxidação de substratos respiratórios e na taxa de redução de O<sub>2</sub>, o que justificaria as maiores taxas respiratórias características dos frutos climatéricos. O mamão, como um fruto climatérico, se caracteriza por apresentar na fase de amadurecimento um aumento na taxa respiratória acompanhado de um pico na taxa de emissão de etileno, além de intensas transformações metabólicas (Paull et al., 1999; Chen and Paull, 2003; Silva et al., 2005; Azevedo et al., 2008). Neste trabalho não foi



observada a ocorrência de um pico característico na taxa respiratória dos frutos intactos, apenas na emissão de etileno (Figura 2). Apesar de não ter sido verificado neste trabalho o pico característico na taxa respiratória, houve aumento na respiração do fruto intacto ao longo do armazenamento (Figura 2) confirmado, também, por um aumento na respiração das mitocôndrias isoladas (Tabela 2).

O desacoplamento das mitocôndrias se deve, entre outros, à atividade de rotas alternativas na CMTE (Vercesi, 2006). O mesmo pode ser resultante da atividade da AOX (Jarmuszkiwicz et al., 2001; Jastroch et al., 2010), estimulada pelo etileno (Solomos e Laties, 1976), ou ainda pela ação da UCP (Almeida et al., 1999; Vercesi, 2001; Jastroch et al., 2010). Os dados obtidos neste trabalho sugerem que o desacoplamento da respiração, durante o amadurecimento de frutos de mamão, é devido provavelmente à ação de duas vias desacopladoras, envolvendo a atuação das proteínas AOX e UCP. Os resultados apresentados a seguir revelam que a atividade destas proteínas, assim como a participação relativa de cada uma no aumento da atividade respiratória, é variável com a evolução do amadurecimento do fruto.

A atividade da via respiratória insensível ao cianeto, resultante da atividade da AOX, também foi avaliada durante o amadurecimento dos frutos de mamão. A partir da taxa de consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas foram feitas estimativas da participação da via da COX e da AOX. Os resultados revelaram que no início do armazenamento do mamão, cerca de 90% do consumo total de O<sub>2</sub> das mitocôndrias extraídas da polpa dos frutos foram devidos à atividade da COX, enquanto o restante, cerca de 10%, se deve à atividade da AOX (Figura 3). Com o amadurecimento dos frutos observa-se uma tendência de diminuição na participação da COX, paralelamente ao aumento na participação da AOX, chegando a 22 % a contribuição da via resistente ao cianeto, no consumo total de O<sub>2</sub>, no nono dia de armazenamento (Figura 3). Não foi verificada respiração residual, não relacionada com a atividade COX nem AOX, uma vez que a adição de 20 µM de PG paralizou totalmente o consumo de O<sub>2</sub> pelas mitocôndrias isoladas.

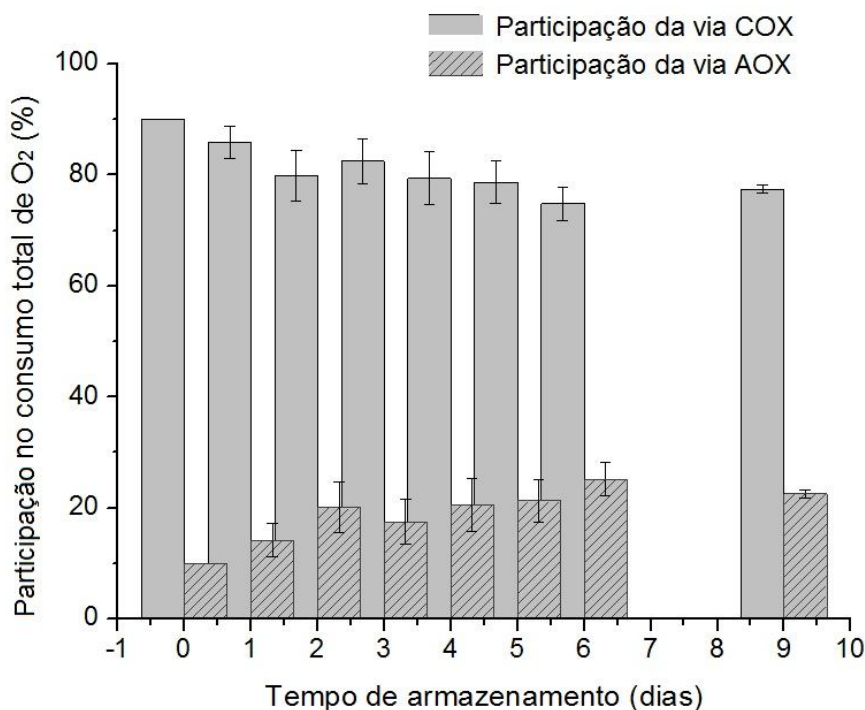


Figura 3. Participação das vias do citocromo c oxidase (COX) e da oxidase alternativa (AOX) no consumo total de  $O_2$  de mitocôndrias isoladas de polpa de frutos de mamão, armazenados a 25 °C por nove dias. As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão de três diferentes preparações mitocondriais. Os dados relativos ao sétimo e oitavo dia de armazenamento foram perdidos.

O aumento na participação da via resistente ao cianeto no consumo total de  $O_2$  com o amadurecimento do fruto já foi verificado também em outros frutos climatéricos como a manga (Considine et al., 2001) e a maçã (Duque e Arrabaça, 1999). No caso do mamão, a via resistente ao cianeto parece ser constitutiva nos frutos (Vanlerberghe e McIntosh, 1997), pois foi verificada atividade da AOX desde o início do processo de amadurecimento (Figura 3). Em manga, os níveis de AOX foram constantes durante quase todo o amadurecimento, sendo máximo no fruto completamente maduro. Esse aumento foi correlacionado com o incremento da respiração resistente ao cianeto (Kumar et al, 1990; Cruz-Hernandez e Gomez-Lim, 1995), indicando que a atividade AOX está relacionada à resposta climática destes frutos. A atividade da AOX em frutos climatéricos parece ser mesmo intrínseca ao desenvolvimento deste órgão e, juntamente com

a UCP, complementam a atividade da COX determinando a taxa de consumo de  $O_2$  (Vercesi et al., 2006).

Além da atividade AOX ser dependente do estágio de desenvolvimento do fruto, essa enzima também responde de forma variável em função do órgão em que se encontra. Pinheiro et al. (2004) não verificaram atividade da AOX em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata armazenados a 28°C, ou após um dia de estresse por frio (4°C). Neste caso, a atividade AOX só foi observada quando os tubérculos foram submetidos ao frio, por no mínimo cinco dias, ou a tratamento de envelhecimento artificial (imersão em solução de  $CaSO_4$ , sob agitação por 24 h). Segundo Dizengremel et al. (1982), a atividade da AOX em tubérculos de batata parece ser estimulada de maneira dependente do tempo de exposição ao estresse.

O papel da AOX no metabolismo vegetal ainda não está bem estabelecido, a exceção da função termogênica em tecidos florais de algumas espécies de Aráceas, onde essa enzima é responsável pela geração de calor, usado para volatilizar compostos aromáticos capazes de atrair insetos polinizadores durante o desenvolvimento floral (Raskin et al., 1989). Também é atribuída à AOX a capacidade de minimizar a geração de EROs, sob condições de estresse, por consumir mais rapidamente os elétrons da CMTE, evitando-se assim que estes possam ser utilizados para a redução parcial do  $O_2$ , que formaria superóxido ou radical hidroxila (Moller, 2001). Para Siedow e Umbach (2000), a AOX tem a função de ajustar o fluxo de elétrons da CMTE quando o metabolismo respiratório é perturbado, sendo gerado um sobrefluxo de elétrons, nem sempre associado ao aumento na produção de energia (ATP) nas mitocôndrias. Segundo estes autores, o sobrefluxo de elétrons é necessário para manter a ciclagem de esqueletos carbônicos através da glicólise e do ciclo dos ácidos tricarbônicos, quando a via COX está reprimida por algum fator de estresse, evitando-se dessa forma a auto-oxidação da ubiquinona reduzida e a subsequente formação de EROs.

A participação da AOX na respiração dos frutos climatéricos e sua correlação com os vários processos metabólicos associados ao amadurecimento de frutos precisam ser melhor compreendidos, podendo ser uma ferramenta útil no desenvolvimento de métodos e procedimentos para prolongar a vida útil, principalmente, de frutos climatéricos. Xu et al. (2011) aplicaram PG, um inibidor específico da ação da AOX (Onda et al 2008), na pós-colheita do tomate e

verificaram efeito desse como inibidor do amadurecimento dos frutos. A aplicação do PG no tomate inibiu a taxa respiratória e a produção de etileno dos frutos, além de interferir em vários atributos ligados à qualidade do fruto, como coloração, firmeza e teor de sólidos solúveis da polpa. Esses autores sugerem que, durante o amadurecimento dos frutos, a AOX teria ação estimuladora na formação de etileno endógeno, através do sistema 2 de produção autocatalítica do etileno. Assim, a aplicação do inibidor da AOX teria efeito sobre a produção autocatalítica de etileno, retardando o amadurecimento dos frutos. Se isto realmente for confirmado em outros frutos climatéricos e, a depender de como é a resposta em frutos não climatéricos, pode estar aí uma “chave” importante na distinção do metabolismo respiratório entre frutos climatéricos e não climatéricos.

Após verificar a participação efetiva da via resistente ao cianeto no consumo de  $O_2$ , buscou-se avaliar a capacidade máxima da oxidase alternativa. Para isso, otimizou-se o meio de reação conforme descrito em material e métodos. A Figura 4 mostra o consumo total de  $O_2$  e aquele dado na presença de KCN, inibidor da COX. A taxa respiratória total foi crescente durante o armazenamento dos frutos, sendo mais elevada no nono dia, quando atingiu  $110,2 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Já a respiração resistente ao cianeto foi similar durante o armazenamento dos frutos, com exceção do primeiro dia, quando foi a mais baixa entre todos os dias avaliados e no nono dia, quando foi máxima, chegando a valores da ordem de  $60,2 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . A respiração resistente ao cianeto no nono dia foi superior aos níveis verificados para a taxa respiratória total dos frutos durante os primeiros dias de armazenamento.

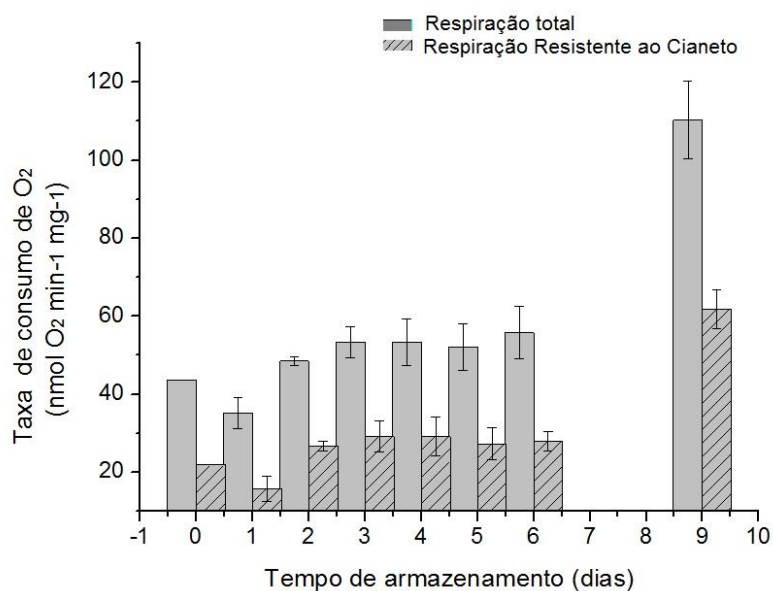


Figura 4. Atividade respiratória de mitocôndrias isoladas de polpa de frutos de mamão armazenados a 25 °C, por até nove dias. O meio de reação foi suplementado com 300 µM de propranolol, 1 mM de ditioneitol (DTT) e 0,15 mM de piruvato, para máxima atividade da AOX. Os dados representam a média ± desvio padrão de três ensaios independentes.

Enquanto a participação relativa da via resistente ao cianeto no consumo total de O<sub>2</sub> em mitocôndrias isoladas se mostrou crescente com o amadurecimento do mamão (Figura 3), a capacidade da AOX se mostrou pouco variável até o sexto dia de armazenamento, apresentando taxa média de consumo de O<sub>2</sub> de 29,5 nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> (Figura 4). Entretanto, no nono dia de armazenamento observou-se um aumento significativo na atividade da AOX, com valor três vezes maior que aquele verificado no início do armazenamento dos frutos.

É sabido que a AOX de plantas é um homodímero, ativado por redução de ponte dissulfeto entre os monômeros (Umbach e Siedow, 1993; Day et al., 1995). Segundo Siedow e Umbach (2000) o sítio de ativação da AOX é bastante conservado nas suas diferentes isoformas. Porém, segundo esses autores a diferença mais marcante entre essas isoformas está na sua regulação pós-tradução. É provável que, nas mitocôndrias da polpa do mamão, o amadurecimento avançado do fruto tenha aumentado a disponibilidade de

piruvato ou succinato, regulando a AOX pós-tradução (Siedow e Umbach, 2000), determinando a diferença na atividade da enzima (Figura 4).

A atividade da UCP nas mitocôndrias isoladas da polpa do mamão foi investigada através do consumo de oxigênio e da determinação do potencial de membrana na presença de um indutor da proteína, o LA. A comprovação da atuação da UCP foi feita a partir da adição de seus inibidores, BSA e ATP, ao meio de reação contendo oligomicina e PG, respectivamente, inibidores da síntese de ATP e da atividade AOX. Os resultados mostraram que na presença do LA houve aumento da taxa respiratória e queda no potencial de membrana nas mitocôndrias dos frutos ao longo do período de armazenamento (Figura 5, Tabela 3). Enquanto nos frutos recém-colhidos a taxa respiratória na presença de LA foi de  $70,4 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ , após cinco dias de armazenamento a mesma foi de  $135,3 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  e  $173,2 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  nas mitocôndrias isoladas de frutos armazenados por nove dias (Figura 5). Estes valores representam um aumento na taxa respiratória das mitocôndrias, com a participação da UCP, de cerca de 93,0 % e 147,0 %, respectivamente, após cinco e nove dias de armazenamento do mamão.

Na Tabela 3 observa-se redução no  $\Delta\Psi$  no início do armazenamento dos frutos, diminuindo de 146,76 mV no estado 3 para 122,39 mV, após a adição do LA. No quinto dia de armazenamento a queda no  $\Delta\Psi$ , em função da adição de LA, foi de 174,78 mV para 142,26 mV, enquanto no nono dia a queda foi de 144,78 mV para 108,32 mV. Esses dados mostram reduções no  $\Delta\Psi$  de 16,6%, 18,6% e 24,8%, respectivamente, no início (tempo 0 de armazenamento), no quinto e no nono dia de armazenamento do mamão, como consequência da ativação da UCP pela adição do LA. Esta queda crescente no  $\Delta\Psi$  está associada ao aumento na atividade da UCP, evidenciando o progressivo desacoplamento das mitocôndrias com o amadurecimento do mamão (Tabela 2). Uma vez que o fluxo de elétrons na CMTE aumenta com o desacoplamento das mitocôndrias, a maior atividade da UCP observada com o amadurecimento do fruto contribuiu para o aumento na atividade respiratória verificada nos frutos intactos de mamão (Figura 2).

Tabela 3. Potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) de mitocôndrias isoladas de polpa de frutos de mamão 'Golden', armazenados à temperatura de 25 °C, por nove dias. Os dados se referem às médias  $\pm$  desvio padrão de três diferentes preparações mitocondriais. Mito: se refere ao potencial inicialmente estabelecido ao se adicionar mitocôndrias isoladas ao meio de reação; + LA: adição de ácido linoléico; + LA + BSA + ATP: adição de ácido linoléico, seguida de BSA e ATP; + LA + BSA + ATP + CCCP: adição de CCCP às adições anteriores.

Tempo de armazenamento (dias)	Potencial de membrana - $\Delta\Psi$ (mV)			
	Mito	Mito+LA	Mito+LA+BSA+ATP	Mito+LA+BSA+ATP+CCCP
0	146,76 $\pm$ 6,0	122,39 $\pm$ 4,0	166,27 $\pm$ 5,0	131,95 $\pm$ 7,0
1	153,08 $\pm$ 5,0	114,66 $\pm$ 3,0	133,08 $\pm$ 8,0	137,92 $\pm$ 8,0
2	150,95 $\pm$ 3,0	104,97 $\pm$ 8,0	150,95 $\pm$ 9,0	112,80 $\pm$ 4,0
3	144,37 $\pm$ 4,0	108,85 $\pm$ 5,0	147,37 $\pm$ 5,0	124,82 $\pm$ 7,0
4	147,33 $\pm$ 5,0	109,19 $\pm$ 4,0	147,33 $\pm$ 6,0	111,11 $\pm$ 9,0
5	174,78 $\pm$ 8,0	142,26 $\pm$ 7,0	184,45 $\pm$ 7,0	101,52 $\pm$ 6,0
6	158,72 $\pm$ 7,0	112,92 $\pm$ 6,0	153,58 $\pm$ 5,0	127,58 $\pm$ 5,0
9	144,78 $\pm$ 6,0	108,32 $\pm$ 8,0	142,45 $\pm$ 4,0	85,02 $\pm$ 9,0

A posterior adição de BSA e ATP ao meio de reação resultou em aumento significativo no  $\Delta\Psi$  destas mitocôndrias, em muitos casos restaurando completamente ou suplantando o  $\Delta\Psi$  registrado antes da adição de LA (Tabela 3). A recuperação do  $\Delta\Psi$  após a adição de BSA e ATP ocorreu em função da capacidade de energização da membrana ser restaurada após a inibição da UCP. O BSA assim como os nucleotídeos de purina (p.ex. ATP) são conhecidos inibidores da UCP (Vercesi et al., 1995; Costa et al., 1999), o que comprova a participação dessa proteína na atividade respiratória durante o amadurecimento do mamão.

Estes dados mostram que entre o início e o quinto dia de armazenamento do mamão houve aumentos mais expressivos na taxa respiratória e quedas no

potencial de membrana com a participação da UCP (com a AOX inibida) (Figura 5, Tabela 3), do que aqueles verificados apenas com a participação da AOX, quando a UCP estava inibida (Figura 4). Por outro lado, quando se compara o aumento da taxa respiratória entre o início e o nono dia de armazenamento, os dados mostram que o maior aumento se deu quando foi estimulada a atividade da AOX (Figura 4), em comparação ao aumento verificado quando esta via estava inibida e a atividade da UCP era estimulada (Figura 5).

Estes resultados mostram a contribuição das duas proteínas, AOX e UCP, para as taxas respiratórias das mitocôndrias isoladas da polpa do mamão durante o seu amadurecimento. Porém, essas vias estão atuando mais intensamente em tempos distintos, iniciando principalmente pela UCP e seguindo com a AOX. Sluse et al. (1998) também observaram diferenças na participação das duas proteínas na respiração do tomate em função do estágio de amadurecimento do fruto, porém a ordem de atuação dessas proteínas foi inversa à observada em mamão. Segundo aqueles autores, a atividade da AOX foi maior no início do amadurecimento do tomate, enquanto que a UCP apresentou maior atividade na fase final do amadurecimento, o que estaria associado a um concomitante aumento na concentração de ácidos graxos livres nos frutos de tomate.

A participação da UCP na atividade respiratória das mitocôndrias isoladas da polpa do mamão também foi avaliada a partir da capacidade funcional da proteína. A Figura 5 mostra uma representação dos traçados relativos à taxa de consumo de  $O_2$  das mitocôndrias isoladas, utilizados para calcular a capacidade funcional da UCP, conforme descrito em *Material e Métodos*.



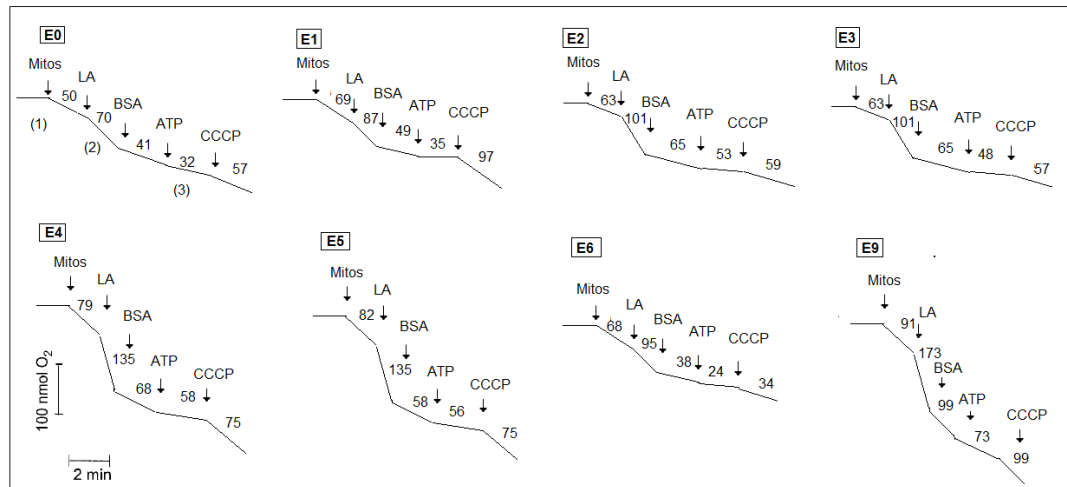


Figura 5. Consumo de  $O_2$  em mitocôndrias isoladas de polpa de mamão armazenado a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  por até nove dias demonstrando a participação da UCP. (E0) Frutos recém-colhidos antes de iniciar o armazenamento; Frutos armazenados por um (E1), dois (E2), três (E3), quatro (E4), cinco (E5), seis (E6) e nove dias (E9). Designação de declividade (em negrito) refere-se a: **(1)** - respiração no estado 3, representa a taxa respiratória de mitocôndrias acopladas; **(2)** - respiração no estado 4 na presença de  $10\text{ }\mu\text{M}$  de LA, representa a taxa respiratória total da mitocôndria que inclui o bombeamento de prótons para o espaço intermembranas pelos complexos I, III e IV com a participação da UCP transportando prótons de volta para a matriz sem passar pela ATP sintase e **(3)** - respiração no estado 4 na presença do BSA 0,5 % e ATP 0,1 mM, representa a taxa respiratória total da mitocôndria com a UCP inibida.

Os resultados mostram uma tendência de aumento na capacidade funcional da UCP com o amadurecimento dos frutos. A capacidade funcional da UCP, dado pela diferença entre a respiração com a participação da UCP (declividade 2 na Figura 5) e a respiração com a UCP inibida (declividade 3 na Figura 5), dos frutos no 1<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 9<sup>o</sup> dia de armazenamento foi de 38, 60 e 100  $\text{nmol O}_2\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ , respectivamente. De acordo com esses resultados é possível afirmar que houve um aumento de aproximadamente 58 % na capacidade funcional da UCP após 5 dias de armazenamento e de cerca de 163 % entre o

início e o nono dia. Calegario et al. (2003) avaliaram a capacidade funcional da UCP em diferentes temperaturas de armazenamento de tubérculos de batata. Os autores observaram um aumento de 44 % na capacidade funcional da UCP quando os tubérculos estavam armazenados à baixa temperatura. No caso do mamão, o aumento mais intenso foi observado após nove dias de amadurecimento dos frutos e deve estar correlacionado com o aumento do desacoplamento mitocondrial, verificado pela redução nos valores de CR (Tabela 2) e pelas reduções no  $\Delta\Psi$  em presença de LA (Tabela 3). Apesar desses resultados, a presença de UCP nessas mitocôndrias deve ser confirmada pelo uso de anticorpos anti-UCP.

Os resultados aqui apresentados sobre as mudanças na respiração de mitocôndrias isoladas com a participação da COX, da AOX e da UCP, durante o amadurecimento do mamão, foram obtidos em condições experimentais onde pelo menos uma das vias alternativas (envolvendo UCP ou AOX) estava bloqueada, enquanto a outra estava ativa. Nestas condições, pode-se, por exemplo, determinar a participação de cada uma dessas duas proteínas na respiração mitocondrial total, como também inferir a respeito da capacidade de determinada via. Na literatura há relato mostrando a capacidade da UCP durante o amadurecimento do tomate (Costa et al., 1999), um fruto climatérico, assim como o mamão, onde os autores verificaram uma tendência crescente ao desacoplamento com o amadurecimento do fruto. Dados semelhantes também foram obtidos para a atividade da AOX em tubérculos de batata armazenados à temperatura ambiente e sob refrigeração (Zhou e Solomos, 1998, Calegario et al., 2003). Estes autores observaram que a baixa temperatura influenciou a atividade respiratória dos tubérculos de batata, com aumento na atividade da AOX e na taxa respiratória, semelhante ao observado no presente trabalho com o amadurecimento do mamão.

Nossos resultados mostraram que a emissão de CO<sub>2</sub> e de etileno durante o amadurecimento do mamão à temperatura de 25°C aumentou consideravelmente, apresentando padrão climatérico apenas para o etileno. A atuação da AOX ocorreu paralelamente ao aumento na taxa respiratória, enquanto a atuação da UCP apresentou maior semelhança com o ocorrido com a taxa de emissão de etileno. O amadurecimento do mamão é uma etapa do desenvolvimento do fruto onde ocorrem profundas transformações, por exemplo, na composição de

açúcares (Gomez et al., 2002), de pigmentos (Fonseca et al., 2007) e constituintes de parede celular (Paull et al., 1999; Chen e Paull, 2003; Lazan et al., 2004; Fontes et al., 2008; Thumdee et al., 2010). As rotas metabólicas que envolvem tais transformações dependem do fornecimento de estruturas orgânicas derivadas do metabolismo respiratório. A necessidade crescente por novos esqueletos carbônicos justifica o aumento na taxa respiratória, que pode estar ligada ao aumento na produção de etileno. Este aumento na demanda por intermediários da rota respiratória pode não estar necessariamente associado ao aumento na demanda por moléculas energéticas como o ATP. Como forma de equilibrar a demanda por intermediários do metabolismo respiratório e a necessidade de produção de ATP, a ativação das proteínas AOX e UCP é fundamental para manter uma alta taxa de fluxo de elétrons na CMTE, com baixa produção de ATP. Isto justifica, portanto, o aumento significativo na capacidade funcional destas duas proteínas, verificado durante o amadurecimento do mamão. Dessa forma, pode-se sugerir que ambas as proteínas AOX e UCP podem ter contribuído para o aumento da respiração dos frutos de mamão durante o seu amadurecimento, em consonância com o aumento da respiração observado nos frutos intactos.

Tanto a UCP quanto a AOX são conhecidas também por terem a expressão elevada sob condições de estresse abiótico por baixa temperatura, baixa concentração de O<sub>2</sub>, aplicação exógena de peróxido de hidrogênio (Zhou e Solomos, 1998; Brandalise et al., 2003; Calegario et al., 2003; Boreck et al., 2005) e por estresse biótico (Hanqing et al., 2010). Mais estudos são necessários para determinar a ligação funcional entre os dois sistemas de dissipação de energia, envolvendo a UCP e a AOX, em mitocôndrias de plantas, especialmente durante períodos tais como o amadurecimento dos frutos, quando o conteúdo de ácidos graxos livres aumenta significativamente (Rouet-Mayer et al., 1995).

#### 4.1.6. Conclusão

Este trabalho confirma que o processo de amadurecimento de frutos de mamão resulta em transformações na firmeza da polpa, na coloração da casca, na emissão de etileno e na taxa respiratória dos frutos. Verificou-se um pico climatérico típico apenas na emissão de etileno, não sendo observado o mesmo para a taxa respiratória que aumentou continuamente até o final do período de armazenamento. A respiração foi máxima no nono dia de armazenamento dos frutos, quando os mesmos já apresentavam a casca totalmente amarelada e muito baixa firmeza de polpa. Há fortes evidências da participação da via resistente ao cianeto e da proteína desacopladora mitocondrial no aumento da atividade respiratória do fruto. Os resultados indicam que a maior participação da AOX ocorreu no final do amadurecimento, em estreita relação com o aumento da taxa respiratória, enquanto a atividade da UCP foi maior aos cinco e nove dias de armazenamento dos frutos, indicando maior proximidade com o padrão de resposta verificado para a emissão de etileno.

#### 4.1.7. Referências bibliográficas

Abeles, F.B., Morgon, P.W., Saltveit Jr., M.E. 1992. Fruit ripening, abscission, and postharvest disorders. *In*: Abeles, F.B., Morgon, P.W., Saltveit Jr., M.E. (eds.) Ethylene in Plant Biology. 2ed. San diego, Academic Press, p. 414.

Almeida, A. M., Jarmuszkiewicz, W., Khomsi, H., Arruda, P., Vercesi, A. E., and Sluse, F. E. 1999. Cyanide-resistant, ATP-synthesis-sustained, and uncoupling-protein-sustained respiration during postharvest ripening of tomato fruit. *Plant. Physiol.* 119,1323–1329.

Azevedo, I. G., Oliveira, J.G., Silva, M.G., Pereira,T., Correia, S.F., Vargas, H., Façanha, A. R. 2008. P-type H<sup>+</sup>ATPases activity, membrane integrity, and apoplastic pH during papaya fruit ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 48, 242-247.

Balbino, J.M.S. Colheita, pós-colheita e fisiologia do amadurecimento do mamão. In: Martins, D.S., Costa, A.F.S. 2003. A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção. Vitória – ES.

Beavis, A.D., Vercesi, A.E. 1992. Anion uniport in plant mitochondria is mediated by a Mg<sup>2+</sup>-insensitive inner membrane anion channel. *J. Biol. Chem.* 267, 3079-3087.

Borecky, J., Vercesi. A.E. 2005. Plant Uncoupling Mitochondrial Protein and Alternative Oxidase: Energy Metabolism and Stress. *Biosci. Rep.* 25, 271-286.

Bradford, M. M. 1976. Microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-259.

Brandalise, M., Maia, I.G., Borecky, J., Vercesi, A.E., Arruda, P. 2003. Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35, 203–209.

Bron, I. U., Jacomino, A. P. 2009. Ethylene action blockade and cold storage affect ripening of Golden papaya fruit. *Acta Physiol. Plant.* 31, 1165-1173.

Calegario, F.F., Cosso, R.G., Fagian, M.M., Almeida, F.V., Jardim, W.F., Jezek, P., Arruda, P., Vercesi, A.E. 2003. Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling

mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35, 211–220.

Chen, N.J., Paull, R.E. 2003. Endoxylanase expressed during papaya fruit ripening: purification, cloning and characterization. *Functional Plant Biol.* 30, 433-441.

Chitarra, M.I.F.; Chitarra, A.B. 2005. *Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio*. 2º ed. Lavras: UFLA pp.98.

Considine, M.J., Daley, D.O., Whelan, J. 2001. The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango, *Plant Physiol.* 126, 1619-1629.

Corrêa, S.F., Batista Filho, M., Silva, M.G., Oliveira, J.G., Aroucha, E.M.M.; Silva, R.F.; Pereira, M.G.; Vargas, H. 2005. Effect of the potassium permanganate during papaya fruit ripening: ethylene production. *J. Phys. IV.* 125, 869-871.

Corrêa, S. F. Mota, L., Paiva, L. B., Couto, F. M., SILVA, M. G., Oliveira, J. G., Sthel, M. S., VARGAS, H. MIKLOS, A. 2011. Effects of ozone exposure on Golden papaya fruit by photoacoustic phase-resolved method: physiological changes associated with carbon dioxide and ethylene emission rates during ripening. *J. Appl. Phycol.* 109, 114701.

Costa, A.D.T., Nantes, I.L., Jezek, P., Leite, A., Arruda, P., Vercesi, A.E. 1999. Plant uncoupling mitochondrial protein activity in mitochondria isolated from tomatoes at different stages of ripening. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 527-533.

Coultate, T.P. 2004. *Alimentos: a química de seus componentes*, 3º ed. Porto Alegre: Artimed, pp. 368

Cruz-Hernández, A., Gómez-Lim, M.A. 1995. Alternative oxidase from mango (*Mangifera indica* L.) is differentially regulated during fruit ripening. *Planta* .197, 569-576.

Day, D.A., Wiskich J.T. 1995. Regulation of alternative oxidase activity in higher plants. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27, 379–385.

Dizengremel, P., Chauveau, M., Roussaux, J. 1982. Inhibition by adenine derivatives of the cyanide-insensitive electron transport pathway of plant mitochondria. *Plant Physiol.* 70, 585-589.

Duque, P., Arrabaça, J.D. 1999. Respiratory metabolism during cold storage of apple fruit. II. Alternative oxidase is induced at the climacteric. *Physiol. Plant.* 107, 24-31.

Fabi, J.P., Cordenunsi, B.R., Barreto, G.P.M., Mercadante, A.Z., Lajolo, F.M. and Nascimento, J.R.O. 2007. Papaya fruit ripening: response to ethylene and 1-Methylcyclopene (1-MCP). *J. Agric. Food Chem.* 55, 6118-6123.

Fonseca, M. J. O., Leal, N. R., Ceni, S. A., Cecon, P. R., Bressan-Smith, R. E., Balbino, J. M. S. 2007. Evolução dos pigmentos durante o amadurecimento de mamão 'Sunrise Solo' e 'Golden'. *Rev. Bras. Frutic.* 29, 451-455.

Fontes, R., V, Santos, M. P., Falqueto, A. R., Silva, D. M. 2008. Atividade da pectinametilesterase e sua relação com a perda de firmeza da polpa de mamão cv. Sunrise Solo e Tainung. *Rev. Bras. Frutic.* 30, 54-58.

Gomez, M., Lajolo, F. and Cordenunsi, B. 2002. Evolution of Soluble Sugars During Ripening of Papaya Fruit and its Relation to Sweet Taste. *J. Food Sci.* 67, 442–447.

González-Meler, M.A., Ribas-Carbo, M., Giles, L., Siedow, J.N. 1999. The effect of growth and measurement temperature on the activity of the alternative respiratory pathway. *Plant Physiol.* 120, 765-772.

Godoy, A. E., Jacomino, A. P., Cerqueira-Pereira, E. C., Gutierrez, A. S. D., Vieira, C. E. M., Forato, L. A. 2010. Injúrias mecânicas e seus efeitos na qualidade de mamões golden. *Rev. Bras. Frutic.* 32, 682-691.

Hanqing, F., Kun, S., Mingquan, L., Hongyu, L., Xin, L., Yan, L., Yifeng, W. 2010. The expression, function and regulation of mitochondrial alternative oxidase under biotic stresses. *Mol. Plant Pathol.* 11, 429–440.

Hiwasa, K., Kinugasa, Y., Amano, S., Hashimoto, A., Nakano, R., Inaba, A., Kubo, Y. 2003. Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit. *J. Exp. Bot.* 54, 771-779.

Holtzapffel, R.C., Finnegan, P.M., Millar, A.H., Badger, M.R., Day, D.A. 2002. Mitochondrial protein expression in tomato fruit during on-vine ripening and cold storage, *Funct. Plant Biol.* 29, 827–834.

Jacomino, A. P., Kluge, R. A., Brackmann, A., Castro, P. R. C. 2002. Amadurecimento e senescência de mamão com 1-metilciclopropeno. *Sci. Agric.* 59, 303-308.

Jacomino, A. P., Gallon, C. Z., Dias, L. S., Pinto Pereira, W. S. 2010. Characterization and occurrence of early softening disorder in 'golden' papaya fruits. *Rev. Bras. Frutic.* 32, 1261-1266.

Jarmuszkiewicz, W., Sluse-Goffart, C.M., Vercesi, A.E., Sluse, F.E. 2001. Alternative oxidase and uncoupling protein: thermogenesis versus cell energy balance. *Biosci Rep.* 21, 213-22.

Jastroch, M., Divakaruni, A.S., Mookerjee, S., Treberg, J.R., Brand, M.D. 2010. Mitochondrial proton and electron leaks. In: Brown, G.C. and Murphy, M.P. (Eds.) *Essays in biochemistry. Mitochondrial function.* Portland Press Limited. London. pp. 53-67.

Jones, W.W., Kubota, H. 1940. Some chemical and respirational changes in the papaya fruit during ripening, and the effects of cold storage on these changes. *Plant Physiol.* 15, 71–717.



Kadenbach, B., Ramzan, R., Wenb,L., Vogt, S. 2010. New extension of the Mitchell Theory for oxidative phosphorylation in mitochondria of living organisms. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* 1800, 205–212.

Kamo, N., Hongoh, R., Kobatake, V. 1979. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenylphosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. Membr. Biol.* 49, 105-121.

Krongyut, W., Srilaong, V., Uthairatanakij, A., Wongs-Aree, C., Esguerra, E.B., Kanlayanarat, S. 2011. Physiological changes and cell wall degradation in papaya fruits cv. 'Kaek Dum' and 'Red Maradol' treated with 1- methylcyclopropene. *Int. Food Res. J.*18, 1251–1259.

Kumar, S., Patil, B.C., Sinha, S.K. 1990. Cyanide resistant respiration is involved in temperature rise in ripening mangoes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 818-822

Kumar, S., Sinha, S.K. 1992. Alternative respiration and heat production in ripening banana fruits (*Musa paradisíaca* var. *Mysore Kadali*). *J. Exp. Bot.* 43, 1639-1642.

Lazan, H., Syu-Yih Ng, Goh, L.-Y., & Ali, Z.M. 2004. Papaya-galactosidase/galactanase isoforms in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening. *Plant. Physiol. Biochem.* 42, 847–853.

Mariano, A.B., Kovalhuk, L., Valente, C., Maurer – Menestrina, J., Pereira – Netto, A.B., Guerra, M.P., Carnieri, E.G.S. 2004. Improved method for isolation of coupled mitochondria of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 47, 873–879.

Mariano, A., Valente, C., Maurer, J., Cadena, S., Rocha, M., Deoliveira, M., Salgado, I. Carnieri, E .2008. Functional characterization of mitochondria isolated

from the ancient gymnosperm *Araucaria angustifolia*. *Plant Sci. (Limerick)*. 175, 701-705.

Martins, I.S., Carnieri, E.G.S., Vercesi, A.E. 1993. Mechanisms of Ca<sup>2+</sup> and anion transport across the inner membrane of plant mitochondria. *Curr. Top. Plant. Physiol.* 1, 211–217.

Matos, A.R., Mendes, A.T., Scotti-Campos, P., Arrabaça, J.D. 2009. Study of the effects of salicylic acid on soybean mitochondrial lipids and respiratory properties using the alternative oxidase as a stress-reporter protein. *Physiol. Plant.* 137, 485–497.

McGuire, R.G. 1992. Reporting of Objective Color measurements. *Hort Sci.* 27, 1254-1255.

Moller, I.M. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 561-591.

Oliveira, J.G., Vitoria, A.P. 2011. Papaya: nutritional and pharmacological characterization, and quality loss due to physiological disorders. An overview. *Food Res. Int.* 44, 1306-1313.

Oliveira, M.A.B., Vianni, R., Souza, G., Araújo, T.M.R. 2002. Caracterização do estágio de maturação do papaia 'Golden' em função da cor. *Rev. Bras. Frut.* 24, 559–561.

Onda, Y., Kato, Y., Abe, Y., Ito, T., Morohashi, M., Ito, Y., Ichikawa, M., Matsukawa, K., Kakizaki, Y., Kiowa, H., Ito, K. 2008. Functional coexpression of the mitochondrial alternative oxidase and uncoupling protein underlies thermoregulation in the thermogenic florets of skunk cabbage. *Plant. Physiol.* 146, 636–645.

Paull, R.E., Chen, N.J. 1983. Postharvest variation in cell wall-degrading enzymes of papaya (*Carica papaya* L.) during fruit ripening. *Plant. Physiol.* 72, 382-385.

Paull, R.E., Nishijima, W., Reyes, M., Cavaletto, C. 1997. Postharvest handling and losses during marketing of papaya (*Carica papaya* L.). *Postharvest Biol. Technol.* 11, 165-179.

Paull, R.E., Gross, K., Qiu, Y. 1999. Changes in papaya cell walls during fruit ripening, *Postharvest Biol. Technol.* 16, p. 79–89.

Prates, R.S. 2005. Aspectos operacionais do programa de exportação do mamão brasileiro para os Estados Unidos: sete anos de sucesso. *In.*: Martins, D.S. *Papaya Brasil. Mercado e Inovações Tecnológicas para o Mamão.* Incaper, Vitória, ES. pp. 57-68.

Pereira, T., Almeida, P.S.G., Azevedo, I.G., Cunha, M., Oliveira, J.G., Silva, M.G., Vargas, H. 2009. Gas diffusion in 'Golden' papaya fruit at different maturity stages. *Postharvest Biol. Technol.* 54, 123-130.

Pinheiro, H. A., Borges, R., Silva, M. A. P., Centeno, D. C. 2004. Activity of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial protein in potato tubers stored at low temperature or submitted to artificial aging. *Braz. J. Plant Physiol.* 16, 69-76.

Raskin, I., Turner, I.M., Melander, W.R. 1989. Regulation of heat production in the inflorescences of an *Arum* Lily by endogenous salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 2214-2218.

Rhodes, M.J.C., Wooltorton, L.S., Galliard, T., Hulme, A.C. 1970. Production of ethylene by whole apple fruits and by tissue slices and cell-free extracts prepared from fruit. *J. Exp. Bot.* 21, 40–48.

Romani, R.J. 1984. Respiration, ethylene, senescence, and homeostasis in an integrated view of postharvest life. *Can. J. Bot.* 62, 2950-2955.

Romani, R.J., Labavitch, T., Yamashita, B., Rae, H. 1983. Preharvest AVG treatment of 'Bartlett' pear fruits: effects on ripening, color change and volatiles. Proc. American Soc. Hortic. Sci. 108, 1046-1049.

Rouet-Mayer, M.A., Valentova, O., Simond-Cote, E., Daussant, J., Thevenot, C. 1995. Critical analysis of phospholipid hydrolyzing activities in ripening tomato fruits: study by spectrofluorimetry and high-performance liquid chromatography. Lipids. 30, 739–746.

Saltveit, M.E. 1999. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. Postharvest Biol. Technol. 15, 279-292.

Selvaraj, Y.; Pal, D.K. 1982. Changes in the chemical composition of papaya (Thailand variety) during growth and development. J. Food Sci. Technol. 19, 257-259.

Siedow, J.N., Umbach, A.L. 2000. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. Biochim. Biophys. Acta. 1459, 432-439.

Silva, H. R. F., Martins, M. L. L., Resende, E. D., Vitorazi, L., Almeida, R. F., Pinto, L. K. A. 2004. Relação entre a atividade da enzima poligalacturonase (PG) e o amadurecimento de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). In: Oliveira, J. G. (ed) Boletim Técnico da II Reunião de pesquisa do Frutimamão, Campos dos Goytacazes – RJ, UENF, pp.331-337.

Silva, M.G., Oliveira, J.G., Vitória, A.P., Correa, S.F., Pereira, M.G., Campostrini, E., Santos, E.O., Cavalli, A., Argas, H., 2005. Correlation between ethylene emission and skin colour changes during papaya (*Carica papaya* L.) fruit ripening. J. Phys. IV. 125, 877–879.

Silva, M. G., Santos, E. O., Sthel, M. S., Cardoso, S. L., Cavalli, A., Monteiro, A. R., Oliveira, J. G., Pereira, M. G., Vargas, H. 2003. Effect of heat treatment on

ethylene and CO<sub>2</sub> emissions rates during papaya (*Carica papaya* L.) fruit ripening. *Rev. Sci. Instrum.* 74, 703-705.

Sluse, F.E.; Almeida A.M., Jarmuszkiewicz, W., Vercesi, A.E. 1998. Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta.* 1365, 319-327.

Siedow, J.N., Umbach, A.L. 2000. The mitochondrial cyanide resistant oxidase: structural conservation and regulatory diversity. *Biochem. Biophys. Acta.* 1459, 432-439.

Solomos, T. 1977. Cyanide-resistant respiration in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28, 279-297.

Solomos, T., Laties, G.G. 1976. Effects of Cyanide and Ethylene on the Respiration of Cyanide-sensitive and Cyanide-resistant Plant Tissues. *Plant. Physiol.* 58, 47-50.

Souza, M. S., Azevedo, I. G.; Corrêa, S. F.; Silva, M. G., Pereira M. G., Oliveira, J. G. 2009. Resposta da aplicação do 1-MCP em frutos de mamoeiro 'Golden' em diferentes estádios de maturação. *Rev. Bras. Frutic.* 31, 693-700.

Tezotto, J. V., Jacomino, A. P., Godoy, A. E., Cerqueira-Pereira, E. C., Gallon, C. Z. 2011. Efeito do corte como dano mecânico na qualidade e na fisiologia de mamões 'golden'. *Rev. Bras. Frutic.* 33, 241-247.

Thumdee, S., Manenoi, A., Chen, N.J., Paull, R.E. 2010. Papaya fruit softening: role of hydrolases. *Trop. Plant Biol.* 3, 98-109.

Umbach, A.L., Siedow, J.N. 1993. Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. *Plant Physiol.* 103, 845-54.

Vanlerberghe, G.C., McIntosh., L. 1997. Alternative oxidase: from gene to function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 48, 703-734.

Vercesi, A.E., Borecký, J., Maia, I.G., Arruda, P., Cuccovia, I.M., Chaimovich. 2006. Plant Uncoupling Mitochondrial Proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 57, 383- 404.

Vercesi, A.E. 2001. The discovery of an uncoupling mitochondrial protein in plants. *Biosci Rep.* 21, 195-200.

Xu, F., Zhang, D.-W., Wang, J.-H., Zhang, Z.-W., Wen, L., Du, J.-B., Shang, J., Yuan, M., Yuan, S. Lin, H.-H. (2011) *N*-Propyl Gallate Is An Inhibitor To Tomato Fruit Ripening. *J. Food Biochem.* doi: 10.1111/j.1745-4514.

Zhou, D., Solomos, T. 1998. Effect of hypoxia on sugar accumulation, respiration, activities of amylase and starch phosphorylase, and induction of alternative oxidase and acid invertase during storage of potato tubers (*Solanum tuberosum* cultivar Russet Burbank) at 1°C. *Physiol. Plant.* 104, 255-265.

Wagner, A.M., Van Der Bergen, C.W.M., Wincencjusz, H. 1995. Stimulation of the alternative pathway by succinate and malate. *Plant Physiol.* 108, 1035–1042.

Wills, R.B.H., Widjanarko, S.B. 1995. Changes in physiology, composition and sensory characteristics of Australian papaya during ripening. *Aust. J. Exp. Agric.* 35, 1173–1176.

## **4.2 Participação da oxidase alternativa e da proteína desacopladora na conservação de frutos de mamão pós-resfriamento**

### **4.2.1. Resumo**

Frutos de mamão 'Golden' no estágio verde maduro (fruto desenvolvido com casca 100% verde) foram armazenados sob baixa temperatura (12°C) e umidade relativa de 85%. Após um período armazenamento sob baixa temperatura os frutos foram transferidos para a temperatura ambiente (25°C), com o objetivo de verificar se a baixa temperatura poderia induzir a atividade das rotas alternativas na atividade respiratória em mitocôndrias isoladas. Foram avaliadas a atividade da AOX e da UCP. Os resultados mostraram um aumento da velocidade respiratória e desacoplamento na presença de ácido linoléico, demonstrando a participação da UCP. De modo geral, não foi observado um pico de produção de etileno e CO<sub>2</sub> nos frutos previamente refrigerados. Os resultados mostraram a participação da via resistente ao cianeto e da proteína desacopladora mitocondrial no aumento da atividade respiratória do fruto, sendo variável com o tempo de exposição à refrigeração. Os resultados indicam que a maior participação da AOX e UCP ocorreu após 20 dias de refrigeração, em estreita relação com o aumento da taxa respiratória nos frutos intactos, ao contrário da emissão de etileno que apresentou tendência de queda em igual período de armazenamento. Dessa maneira é possível afirmar que longos períodos de refrigeração podem afetar a taxa respiratória na medida em que promovem um estímulo da respiração no período de prateleira, afetando diretamente o produto na fase final de comercialização.

## **4.2. Involvement of alternative oxidase and uncoupling protein in the conservation of papaya post-cooling**

### **4.2.2 ABSTRACT**

Fruits of papaya 'Golden' in mature green stage (fruit developed with 100% green bark) were stored at low temperature (12 ° C) and relative humidity of 85%. After a period under low temperature storage the fruit were transferred to room temperature (25 ° C), in order to verify that the low temperature could induce the activity of the alternative routes in the respiratory activity in isolated mitochondria. We evaluated the activity of AOX and UCP. The results showed an increase in respiratory rate and uncoupling in the presence of linoleic acid, demonstrating the involvement of CPU. Overall, there was one peak of ethylene production and CO<sub>2</sub> in previously chilled fruit. The results show the involvement of the track resistant cyanide and the uncoupling protein to increase the mitochondrial respiratory activity of the fruit being variable with time of exposure to cooling. The results indicate that the greater participation of AOX and UCP occurred after 20 days of refrigeration, in close relation with the increase in respiratory rate in intact fruit, unlike the emission of ethylene tended to fall in the same period of storage. Thus we can say that long periods of cooling can affect the respiratory rate as an incentive to promote breathing during shelf, directly affecting the product in the final stages of commercialization.



### 4.2.3. Introdução

O mamão é um fruto climatérico cujas transformações resultantes do amadurecimento ocorrem rapidamente após a colheita do fruto fisiologicamente maduro. Estas transformações são desencadeadas pela produção do etileno e aumento da taxa respiratória (Paull, 1993). Isso caracteriza o mamão como um fruto com vida pós-colheita relativamente curta, o que faz com que o prolongamento do tempo de prateleira destes frutos seja um fator de importância econômica para a comercialização deste produto no mercado externo.

Dada essa alta perecibilidade, o controle do amadurecimento é fundamental para o aumento na vida útil após a colheita do mamão, visando o mercado interno e a exportação dos frutos. Dessa forma, estudos têm sido feitos para ampliar o conhecimento dos processos bioquímicos envolvidos no amadurecimento de frutos, com o objetivo de elucidar fatores passíveis de manipulação, controle ou interferência, possibilitando modificações que permitam estender a vida útil destes frutos.

O armazenamento refrigerado dos frutos de mamão tem sido empregado como uma das principais estratégias para conservação (Nunes e Emond, 2003). A redução na temperatura de armazenamento do fruto diminui a atividade metabólica, em geral, especialmente a respiratória. O processo respiratório é estritamente dependente da temperatura ambiente. Dentro da faixa biológica, uma redução de 10°C na temperatura ambiente reduz a taxa respiratória à metade (Atkin e Tjoelker, 2003). Com a queda na atividade respiratória, o metabolismo do

fruto, de modo geral, também será reduzido, conseqüentemente, o seu amadurecimento, prolongando a sua vida-útil.

A conservação do fruto de mamão sob baixa temperatura pode ajudar a estender sua vida útil. No entanto, após a saída deste fruto da condição de resfriamento, o que se observa é uma aceleração do processo de amadurecimento com subseqüentes transformações dos atributos de qualidade dos frutos, como a perda da pigmentação verde da casca e a diminuição da consistência da polpa (An e Paull, 1990). Isto faz com que o fruto perca, em muito pouco tempo, qualidade para o consumo, além de dificultar a sua comercialização, uma vez que se tornam mais susceptíveis a danos mecânicos quando da sua manipulação (Paull et al., 1997).

Por outro lado, sabe-se que a baixa temperatura pode alterar o metabolismo respiratório em batata (Calegario et al., 2003; Pinheiro et al., 2004), *Vigna radiata* (González-Meler et al., 1999), maçã (Duque e Arrabaça, 1999) e tomate (Holtzapffel et al., 2002), intensificando a dissipação do gradiente eletroquímico de prótons. Tal efeito está relacionado à operação de “rotas alternativas” como a respiração resistente ao cianeto, pela operação da AOX e à atuação da UCP.

A UCP ou proteína desacopladora de plantas superiores foi isolada pela primeira vez a partir de mitocôndrias de tubérculos de batata e foi caracterizada como uma proteína de 32 kDa (Vercesi et al., 1995; Laloj et al., 1997). Esta proteína é semelhante à proteína desacopladora animal, atuando como dissipadora do gradiente eletroquímico de prótons gerado pela atividade respiratória. A UCP é estimulada por ácido linoleico e inibida por albumina de soro bovino (BSA) ou por bases purínicas como o ATP, GTP, ADP e GDP (Jezek et al., 1996; Vercesi et al., 1998). Entre as funções fisiológicas da UCP está uma possível ação termogênica, além da participação na regulação da geração de espécies reativas de oxigênio, como resposta às situações de estresse, como por exemplo o frio (Vercesi et al., 2006).

A AOX é uma oxidase alternativa do ubiquinol resistente ao cianeto que pode promover o fluxo de elétrons na CMTE, sem a participação da oxidase do citocromo c. A sua atuação resulta na formação de um menor gradiente eletroquímico de prótons, com diminuição na produção de ATP e conseqüente liberação da energia sob a forma de calor. A atividade AOX pode ser inibida por

ácidos hidroxâmicos como o SHAM e o PG (Day et al., 1995; Siedow e Umbach 1995; Wagner e Krab 1995; Vanlerberghe e McIntosh 1997) e estimulada por ácidos orgânicos como o piruvato (Millar et al., 1996).

À AOX tem sido atribuída a participação na termogênese (Elthon e McIntosh, 1986), proteção contra o estresse oxidativo mitocondrial em tubérculos de batata armazenados à baixa temperatura (Calegario et al., 2003; Pinheiro et al., 2004), em feijão, *Vigna radiata*, (González-Meler et al., 1999) e células de tabaco (Vanlerberghe e McIntosh, 1992), no amadurecimento de abacate (Solomos e Laties, 1974; Moreau e Romani, 1982), de banana (Kumar e Sinha, 1992) e de manga (Kumar et al., 1990; Cruz-Hernández e Gómez-Lim, 1995) e no armazenamento de maçã sob baixa temperatura (Duque e Arrabaça, 1999).

Segundo Duque e Arrabaça (1999), frutos de maçã apresentaram um aumento (climatérico) na taxa respiratória quando armazenados à baixa temperatura (4°C). Segundo esses autores, o aumento na respiração dos frutos sob baixa temperatura seria devido à ativação (atividade cinco vezes maior) da AOX pelo frio.

Em mitocôndrias isoladas de frutos de tomate, o nível de proteína AOX diminuiu com o amadurecimento da fruta (do verde para a fase de vermelho). Em contraste, os níveis da UCP diminuíram a partir da fase amarela, sugerindo um papel diferencial destas proteínas sobre o processo de amadurecimento pós-colheita do tomate (Jezek et al., 1996; Almeida et al., 1999).

Trabalhos mostram que as duas rotas alternativas de desacoplamento da CMTE, através da UCP e da AOX, sob condições específicas, podem estar atuando no mesmo órgão (p.ex. o fruto), dependendo do estágio de desenvolvimento deste, com regulação e eficiência distintas (Calegario et al., 2003; Vercesi et al., 2006).

Em mamão alguns estudos têm fornecido informações sobre eventos bioquímicos (Azevedo et al., 2008) e fenológicos (Pereira et al., 2009) que ocorrem durante o amadurecimento do fruto, associados com as mudanças na emissão de etileno e na taxa respiratória. Porém, há uma carência de informações na literatura a respeito da atividade respiratória em mitocôndrias isoladas do fruto do mamoeiro e a participação das rotas desacopladoras durante o amadurecimento do fruto.

As informações obtidas a cerca do funcionamento das rotas

desacopladoras em mitocôndrias de mamão poderão contribuir para um maior entendimento do metabolismo respiratório em mamão, com possibilidade de utilização dessas informações para prolongamento da vida útil dos frutos armazenados.

O objetivo do trabalho foi verificar se o armazenamento de frutos de mamão sob baixa temperatura poderia estar induzindo a atividade das rotas desacopladoras, promovendo uma aceleração do processo respiratório após o retorno à temperatura ambiente, contribuindo, dessa forma, para a redução na vida útil destes frutos.

#### **4.2.4. Material e Métodos**

##### 4.2.4.1. Material vegetal e condições de armazenamento

Foram utilizados frutos de mamão 'Golden', procedentes de pomares pertencentes à empresa Caliman Agrícola S/A localizados em 19°15'S e 39°51'70" W na cidade de Linhares, ES. Os frutos foram colhidos no campo e, após lavagem e seleção na casa de embalagens, imediatamente transportados para o Setor de Fisiologia Vegetal da UENF, em Campos dos Goytacazes (RJ), a cerca de seis horas do local da colheita. Os frutos no estágio 0 de maturação (fruto desenvolvido com casca 100% verde) (Prates, 2005) foram armazenados por 4, 12 e 20 dias a 12°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), em câmaras com controle de temperatura e umidade relativa (80%  $\pm 5\%$ ). Ao final de cada período de armazenamento à baixa temperatura, os frutos foram transferidos para câmaras a 25°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) com umidade relativa de 80% ( $\pm 5\%$ ), sendo avaliados aos 0, 2, 4 e 6 dias de prateleira (Figura 1). A progressão do amadurecimento dos frutos foi caracterizada pela emissão de gases CO<sub>2</sub> e etileno nos frutos intactos e através da análise dos atributos físico-químicos.

#### 4.2.4.2. Avaliação dos atributos físico-químicos

As medições da coloração da casca do fruto foram realizadas utilizando um colorímetro portátil (Chroma Meter, modelo CR-300, Minolta, Japão), registrando-se as variáveis de cor dentro do espaço CIELAB:  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e o ângulo de cor *hue* (McGuire, 1992). A firmeza da polpa foi obtida por meio da resistência à penetração, utilizando-se um penetrômetro digital de bancada (Fruit Pressure Tester, modelo 53205, TR, Itália), com corpo de prova de 8 mm. O teor de sólidos solúveis (SS) foi determinado utilizando-se um refratômetro portátil (Atago N1, França) e os resultados expressos em °Brix.

#### 4.2.4.3. Avaliações da emissão de CO<sub>2</sub> e etileno

Para a quantificação da produção dos gases CO<sub>2</sub> e C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> foi utilizado um espectrômetro fotoacústico, acoplado a um analisador de gás no infravermelho. Neste sistema as mudanças de pressão são detectadas por um microfone colocado no interior de um tubo ressonador da célula fotoacústica, através do qual flui a amostra gasosa contendo as moléculas sob investigação. O sinal acústico é produzido pela flutuação periódica de pressão dentro da célula fotoacústica (Corrêa et al., 2011).

Individualmente os frutos foram colocados dentro de uma câmara (porta amostra) de cerca de 1,0 L, com o ar ambiente sendo utilizado como gás de arraste a partir de monitoramento por controladores eletrônicos.

Este fluxo passa pelo analisador de gás no infravermelho - URAS, para medição do conteúdo de CO<sub>2</sub> e, posteriormente, por filtros contendo KOH e CaCl<sub>2</sub> para eliminar CO<sub>2</sub> e água, respectivamente, no gás analisado. Antes de o gás entrar na célula fotoacústica o mesmo passa através de uma armadilha de N<sub>2</sub> líquido, evitando-se assim a interferência de traços de gases. Após a passagem pela célula fotoacústica o fluxo é lançado para o ambiente. Por meio dessa montagem experimental é possível monitorar simultaneamente a produção de etileno e de CO<sub>2</sub> em frutos intactos na ordem de partes por bilhão (ppb), apresentando a vantagem de medir os gases em tempo real, não havendo a necessidade de acúmulo do gás. (Corrêa et al., 2005; Silva et al., 2005; Azevedo et al., 2008; Pereira et al., 2009; Corrêa et al., 2011).

#### 4.2.4.4. Isolamentos das mitocôndrias

As mitocôndrias foram isoladas a 4°C, utilizando-se cerca de 300g da polpa dos mesmos frutos utilizados para as análises físico-químicas. O tecido foi homogeneizado em centrífuga (Juicer, modelo R16720, Walita, Brazil) em cerca de 1,0 L de tampão de isolamento [manitol 0,35 M, MOPS 50 mM, EDTA 3 mM, Cys 8 mM, BSA 0,1% (p/v), PVP-25 0,4% (p/v), pH 7,4] sob agitação constante. O homogenato foi filtrado através de quatro camadas de gaze e uma de Miracloth (Calbiochem, CA, USA) e centrifugado a 1.500 g, por 15 min. O sobrenadante foi centrifugado a 15.000 g, por 15 min, sendo o *pellet* ressuscitado em tampão de lavagem [manitol 0,35 M, MOPS 10 mM, EDTA 0.5 mM, BSA 0,1% (p/v), pH 7,2]. Esta suspensão foi centrifugada a 1.000 g por 8 min, sendo o sobrenadante novamente centrifugado a 9.000 g por 15 min para obtenção das mitocôndrias no precipitado.

Para a purificação das mitocôndrias foi utilizado um gradiente em *percoll*. O precipitado coletado foi suspenso em 1 a 2 mL do tampão de lavagem e vertido sobre 30 mL de tampão de purificação [*percoll* 22,5 % (v/v), manitol 0,6 M, MOPS 10 mM, BSA 0,5% (p/v), pH 7,2] sendo centrifugado a 12.000 g por 45 min. As mitocôndrias purificadas foram coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur, na região basal dos tubos, sendo diluídas aproximadamente dez vezes com tampão de lavagem e centrifugadas a 10.000 g por 15 min. O procedimento seguiu o protocolo proposto por Duque e Arrabaça (1999), com modificações.

A concentração de proteínas foi determinada espectrofotometricamente a 595 nm como descrito por Bradford (1976), utilizando BSA como proteína padrão.

##### 4.2.4.4.1. Atividade respiratória

Foi utilizado 1 mg de proteína para determinação da atividade respiratória das mitocôndrias isoladas pelo método poralográfico usando um eletrodo de O<sub>2</sub> tipo Clark (Hansatech, Respire 1, UK) em 1,0 mL de meio de reação [manitol 0,35 M, tampão fosfato 10 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, BSA 0,5% (p/v), pH 7,2] à temperatura de 25°C. Todo o ensaio foi realizado na presença de ATP 200 µM,

além de malato 10 mM e glutamato 20 mM como substratos oxidáveis. Após a adição de 100 nmoles de ADP ao meio de reação foram registrados os estados 3 e 4 da respiração, evidenciando a capacidade fosforilativa das mitocôndrias. Os controles respiratórios calculados para as adições de 100 nmoles de ADP variaram de 3,8 (4 dias a 12°C + 4 dias a 25°C) a 2,1 (20 dias a 12°C + 6 dias a 25°C), considerados bons índices para mitocôndrias vegetais (Duque e Arrabaça, 1999; Pinheiro et al., 2004; Mariano et al., 2008), o que demonstra boas preparações mitocondriais.

A avaliação da via respiratória resistente ao cianeto foi obtida através da atividade da oxidase alternativa a partir da medição da taxa de consumo de O<sub>2</sub> na presença de KCN 3 mM em mitocôndrias no estado 4 de fosforilação (Duque e Arrabaça, 1999).

A capacidade de AOX foi avaliada utilizando o meio de reação descrito acima, suplementado com 2,5 µg de oligomicina e 300 µM de propranolol para inibir a ATP-sintase e o canal aniônico celular, respectivamente (Beavis e Vercesi, 1992; Martins et al., 1993; Calegario et al., 2003), além de adições de 1 mM de DTT e 0,15 mM de piruvato para ativar a AOX (Wagner et al., 1995) e BSA 0,5% (p/v) para inibir a atividade da UCP. A inibição da citocromo oxidase se deu a partir da adição de 3 mM de KCN ao meio de reação, enquanto a adição de 20 µM de PG visou a inibição da AOX.

Obtidos os traçados e calculadas as taxas de consumo de O<sub>2</sub> das mitocôndrias isoladas, foram calculados os percentuais da respiração total e da respiração resistente ao cianeto para efeito de comparação entre as vias de consumo de O<sub>2</sub>.

A capacidade de UCP foi medida usando-se 5 mg de proteína mitocondrial em 1,0 mL de meio de reação sem BSA suplementado com 300 µM de propranolol e 20 µM de PG pelas mesmas razões descritas anteriormente. A este meio de reação foram adicionados 2,5 µg de oligomicina e 20 µM de atractilósídeo, bloqueadores da ATP-sintase e do transportador de membrana ADP/ATP, respectivamente, além de 10µM de LA para promover a atividade da UCP (Mariano et al., 2008). Para inibir a atividade da UCP foram adicionados BSA 0,5% (p/v) e ATP 1 mM. Finalmente, para promover o completo desacoplamento da mitocôndria foi adicionado 5 µM de Cianeto de Carbonil Meta-Clorofenil Hidrazona (CCCP) ao meio de reação (Almeida et al., 1999).

#### 4.2.4.5. Avaliação do potencial elétrico de membrana

O potencial elétrico de membrana ( $\Delta\Psi$ ) foi determinado utilizando um eletrodo de cloreto de tetrafenilfosfônio (TPP<sup>+</sup>), construído no Setor de Fisiologia Vegetal do LMGV/UENF, de acordo com Kamo et al. (1979). Para as avaliações foram utilizadas 5 mg de proteína mitocondrial em 1,0 mL de meio de reação sem BSA, suplementado com 2,5  $\mu\text{g}$  de oligomicina, 300  $\mu\text{M}$  de propranolol, 20  $\mu\text{M}$  de atractilósídeo e 20  $\mu\text{M}$  de *n*-propilgalato. Durante o registro do potencial de membrana foram adicionados ao meio de reação 10  $\mu\text{M}$  de LA para induzir a atividade da UCP, seguido de BSA 0,5% (p/v) e 1 mM de ATP para inibir a atividade da UCP, além de 5  $\mu\text{M}$  de CCCP para promover o completo desacoplamento mitocondrial.

#### 4.2.4.6. Análises estatísticas

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey para a comparação das médias. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados em nível de significância  $p < 0,05$ .

### 4.2.3. Resultados e Discussão

A evolução do amadurecimento do mamão sob baixa temperatura a 12°C, seguido do período de prateleira a 25°C foi acompanhada pela análise dos parâmetros de cor  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e ângulo *hue*, firmeza da polpa e teor de SS, como apresentado nas Figuras 1, 2 e 3, respectivamente. Os dados apresentados aqui mostram uma diminuição do ângulo *hue* durante o armazenamento dos frutos, que evidencia a evolução da cor da casca do verde para o amarelo (Figura 1 e 2),



confirmada pelo aumento dos valores dos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$ , que também mostram a perda da coloração verde e o amarelecimento da casca, respectivamente, durante o amadurecimento do mamão. Foi observado também um aumento da luminosidade da casca, dado pelo índice  $L$  (Figura 2). Durante o amadurecimento dos frutos a média dos valores de  $L$  foi superior a 50, em todos os períodos de armazenamento, o que corresponde a cores claras.



Figura 1. Imagens fotográficas da visão geral dos frutos após o armazenamento à temperatura de 12°C e durante o período de prateleira a que os frutos foram submetidos.

Nos frutos armazenados por 4 dias sob baixa temperatura, os parâmetros  $a^*$  e ângulo de cor hue indicaram uma maior retenção de coloração verde em relação ao controle (Figura 1 e 2). Nestes frutos o ângulo de cor hue apresentou maiores valores. Esta mesma resposta foi observada também nos frutos armazenados por 12 dias sob baixa temperatura. Entretanto, quando estes frutos foram armazenados por 20 dias sob baixa temperatura, observou-se uma redução na perda de coloração verde. Para os parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  os valores indicam mudança em todos os períodos de armazenamento em relação ao controle, indicando que o tempo de armazenamento influenciou na perda de coloração verde, assim como redução nos valores do ângulo hue, indicando intenso processo de amarelecimento da casca (Figura 2). Esses dados estão próximos àqueles mencionados na literatura, confirmando a variação de tonalidade da casca do mamão do verde para o amarelo brilhante, durante o amadurecimento

dos frutos de mamoeiro (Oliveira et al., 2002; Hernández et al., 2006; Souza et al., 2009; Pereira et al., 2009), ou o amadurecimento da banana (Lima et al., 2005) e da manga (Hofman et al., 2001).

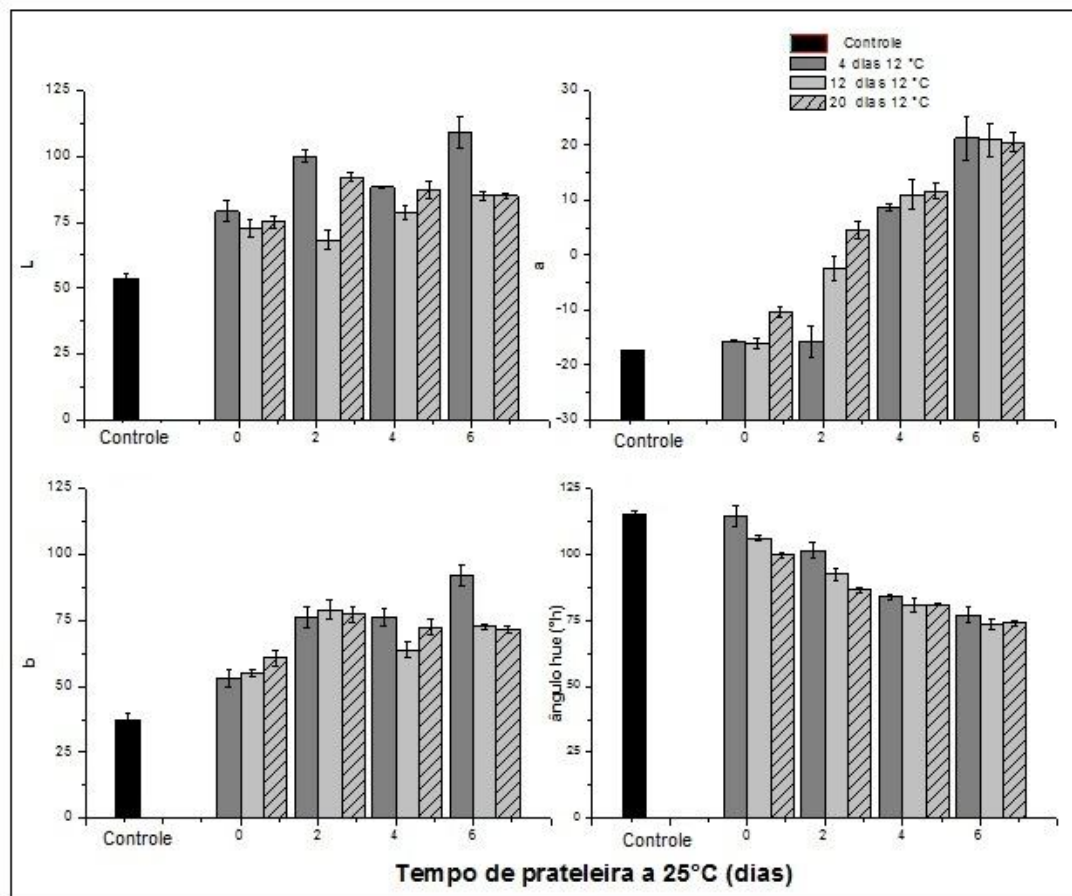


Figura 2. Parâmetros de cor  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e ângulo de cor  $hue$  ( $h^\circ$ ) em frutos de mamoeiro 'Golden' armazenados por 4, 12 e 20 dias sob baixa temperatura a  $12^\circ\text{C}$ , com amostragens aos 0, 2, 4 e 6 dias de prateleira a  $25^\circ\text{C}$ . O controle representa os frutos avaliados no primeiro dia de coleta. Barras verticais indicam o desvio padrão da média

A mudança na coloração da casca do fruto, do verde para o amarelo, é um evento típico que ocorre durante a fase de amadurecimento do fruto do mamão. Alterações na pigmentação da casca durante essa fase envolvem, entre outros, a degradação das clorofilas e a biossíntese de carotenoides (Wills e Widjanarko, 1995; Mendonça et al., 2003).

O teor de SS aumentou com o tempo de armazenamento, oscilando entre  $10,0^\circ\text{Brix}$  a  $12,6^\circ\text{Brix}$  (Figura 3A). Estes resultados são semelhantes àqueles

observados por Souza et al. (2009), que verificaram também pouca variação neste atributo durante o amadurecimento do mamão. O teor de SS fornece uma estimativa da proporção de açúcares solúveis contidos na polpa do fruto (Avedo et al.2008). Em média, o teor de SS dos frutos estava de acordo com o que preconiza Almeida et al. (2003), que sugerem que o mamão, em geral, deva atingir pelo menos 11,5 °Brix, para manutenção da qualidade para exportação.

A perda da firmeza aliada à mudança da coloração é a transformação mais característica que ocorre durante o amadurecimento em frutos de mamão, um importante atributo de qualidade das frutas (Lazan et al., 1987; Pereira et al., 2009). Na Figura 3B, observa-se que o armazenamento dos frutos por 4 dias sob baixa temperatura retardou a perda da firmeza da polpa do fruto, o qual apresentou valor de 80,72 N, no tempo 0 de prateleira. No entanto, a partir do segundo dia de prateleira ocorreu um decréscimo significativo deste atributo, que apresentou valores abaixo de 4,0 N. Os frutos armazenados sob baixa temperatura por períodos mais longos que 4 dias não mostraram efeito na retenção da firmeza. Em todos estes frutos observou-se a rápida perda da firmeza chegando a valores abaixo 3,0 N, indicando o rápido amolecimento da polpa.

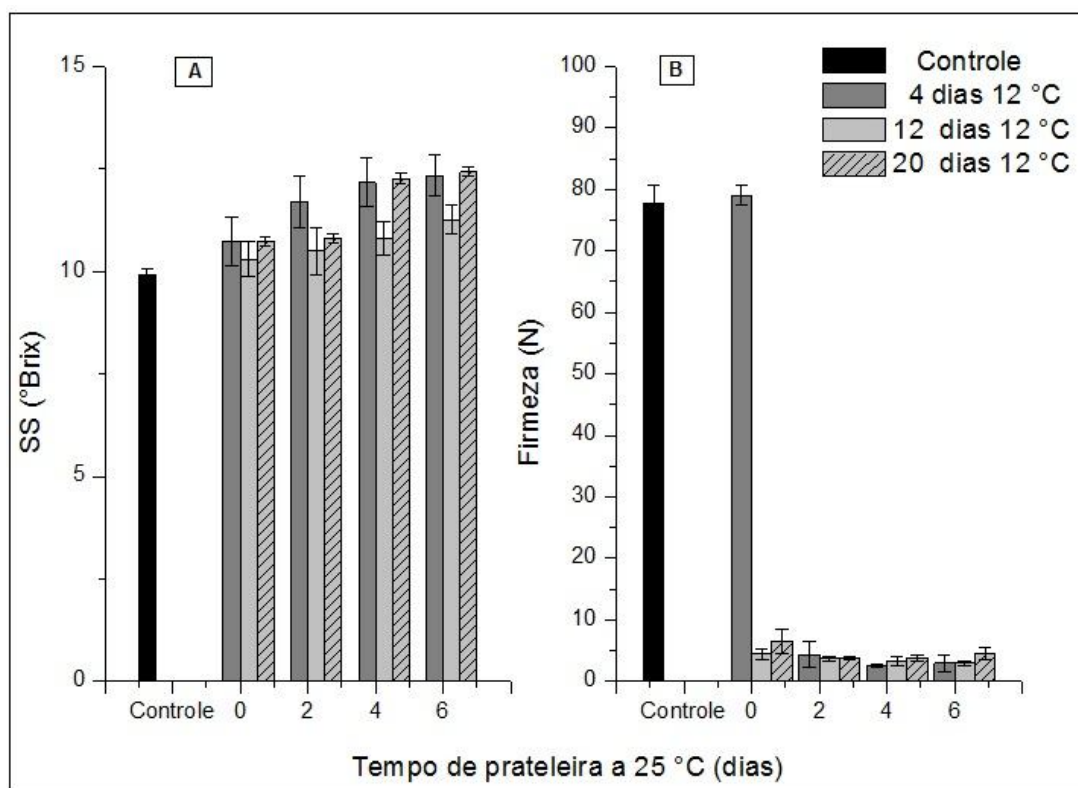


Figura 3. Teor de sólidos solúveis (A) e firmeza da polpa (B) em frutos de mamoeiro 'Golden' armazenados por 4, 12 e 20 dias sob baixa temperatura a 12°C, com amostragens aos 0, 2, 4 e 6 dias de prateleira a 25°C. O controle representa os frutos avaliados no primeiro dia de coleta. Barras verticais indicam o desvio padrão da média.

A perda da firmeza dos frutos de mamão ocorre principalmente devido à ruptura celular e à atividade enzimática. A ruptura celular pode resultar no colapso da membrana desencadeando reações como amolecimento. Este amolecimento da polpa do fruto se dá em função da ativação de enzimas que promovem a degradação da parede celular, tais como pectinametilesterase (PME, EC 3.2.1.11), endopoligalacturonase (endoPG, EC 3.2.1.15), endoglucanase (EGase, EC 3.2.1.4),  $\beta$ -xilosidase (EC 3.2.1.37),  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal, EC 3.2.1.23) e endo-1,4- $\beta$ -xylanase (EC 3.2.1.8) (Paull e Chen, 1983; Paull et al., 1999; Chen e Paull, 2003; Lazan et al., 2004; Owino et al., 2004; Fontes et al., 2008; Thumdee et al., 2010; Oliveira e Vitoria, 2011). Estas enzimas podem ser ativadas em resposta ao aumento da emissão de etileno e da respiração.

O acompanhamento da taxa de emissão do etileno é essencial para a definição do climatério (Saltveit, 1999). Na Figura 4 é possível observar um aumento considerável na taxa de emissão de etileno nos frutos de mamão armazenados por 4 dias a 12°C. Nestes frutos, a emissão do etileno aumentou cerca de três vezes entre o 2º e 6º dia de prateleira, apresentando valores de 0,54  $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$  e 1,76  $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectivamente. A partir destes resultados, não é possível identificar claramente a ocorrência de um pico da emissão do etileno, mas sim que ocorreu um aumento significativo na emissão deste hormônio, coincidindo com as transformações mais marcantes observadas nos atributos físico-químicos do mamão, como o amarelecimento da casca (ângulo *hue* abaixo de 90 °h) e a perda de firmeza da polpa.

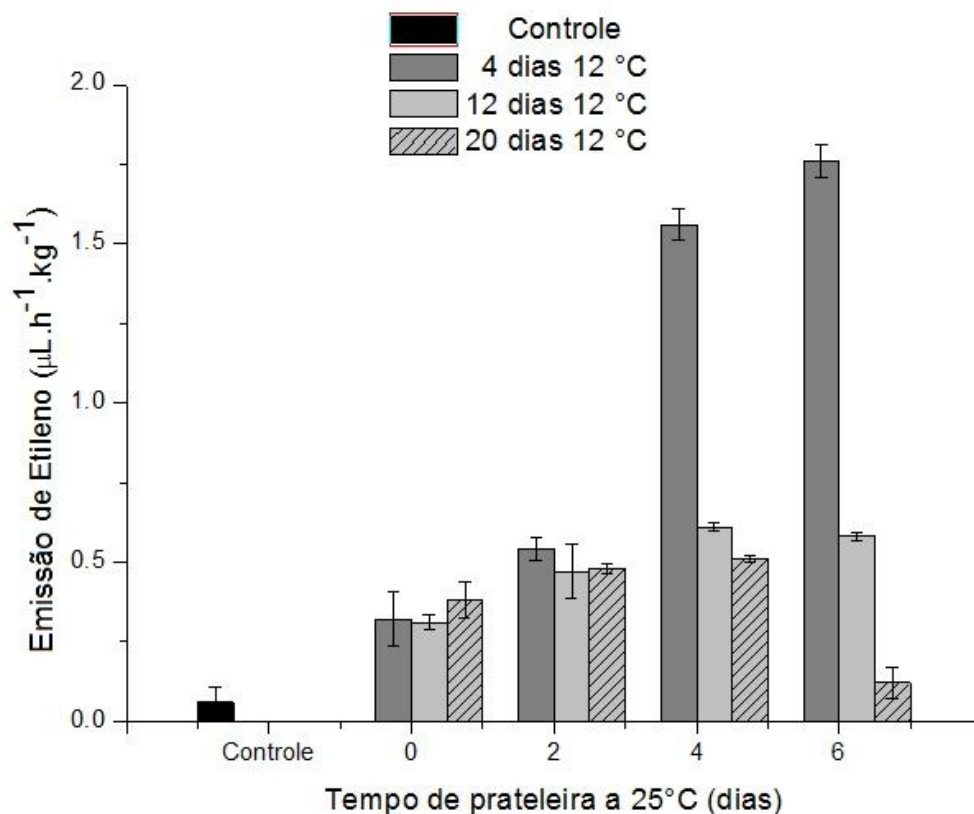


Figura 4. Taxa de emissão de etileno em frutos de mamão 'Golden' mantidos por 4, 12 e 20 dias sob baixa temperatura a 12°C com amostragens aos 0, 2, 4 e 6 dias de prateleira a 25°C. O controle representa os frutos avaliados no primeiro dia de coleta. Barras verticais indicam o desvio padrão da média .

Nos frutos armazenados por 12 dias sob baixa temperatura, a emissão de etileno aumentou em relação ao controle, entretanto permaneceu constante ao longo dos seis dias de prateleira, apresentando valores entre  $0,31 \mu\text{L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$  e  $0,58 \mu\text{L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ , no início e final do armazenamento a 25°C. Quando os frutos foram armazenados por 20 dias a 12 °C observou-se uma maior queda na taxa de emissão de etileno no 6º dia de prateleira, apresentando valores entre  $0,38 \mu\text{L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$  e  $0,12 \mu\text{L.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ , no início e final do armazenamento a 25°C ao longo dos seis dias de prateleira. Estes dados demonstram que o armazenamento dos frutos à baixa temperatura por períodos mais longos, pode ter sido eficiente em retardar a emissão de etileno (Figura 4).

Estes resultados corroboram com Souza et al. (2007), que verificaram o efeito da baixa temperatura inibindo a produção de etileno nos frutos de mamão

'Golden'. Segundo os autores, a interrupção na produção de etileno por um determinado tempo através da baixa temperatura, afeta a sensibilidade dos receptores celulares, impedindo assim, a produção de etileno quando os frutos são armazenados posteriormente à temperatura ambiente.

No presente trabalho a manutenção ou redução na produção de etileno observada nos frutos armazenados à baixa temperatura por 12 e 20 dias pode estar relacionada à formação de poucas moléculas receptoras ou a não ativação destas moléculas em frutos. Bron (2006) e An e Paull (1990) também observaram esse padrão de resposta em mamão. Fonseca et al. (2006) em estudo de emissão de etileno e CO<sub>2</sub> nos frutos de mamão, verificaram que a baixa temperatura *per se*, foi suficiente para retenção do metabolismo dos frutos durante o armazenamento, inibindo a produção de etileno.

A taxa de emissão de CO<sub>2</sub> também não apresentou pico característico (Figura 5). Observou-se, contudo, uma tendência de aumento na emissão desse gás nos frutos armazenados nos distintos períodos sob baixa temperatura. A emissão de CO<sub>2</sub> foi de 12,08 mL.h<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup> no tempo 0 e 23,96 mL.h<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup> no 6º dia de prateleira, em frutos refrigerados por 4 dias e 17,43 mL.h<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup> e 32,98 mL.h<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup>, em igual período de prateleira, respectivamente, quando os frutos foram refrigerados por 20 dias. Estes resultados mostram que o período de resfriamento dos frutos atuou de forma a acelerar a taxa respiratória, quando estes frutos foram transferidos para a temperatura ambiente. Entretanto, observou-se uma queda na emissão de CO<sub>2</sub> a partir do segundo dia de prateleira, quando os frutos foram previamente refrigerados por 12 dias. Neste caso, a taxa de emissão de CO<sub>2</sub> variou de 24,92 mL.h<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup> para 16,96 mL.h<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup> entre o 2º e o 6º dia de prateleira, respectivamente (Figura 5), mostrando que este período de armazenamento sob baixa temperatura foi eficiente na redução da taxa respiratória.

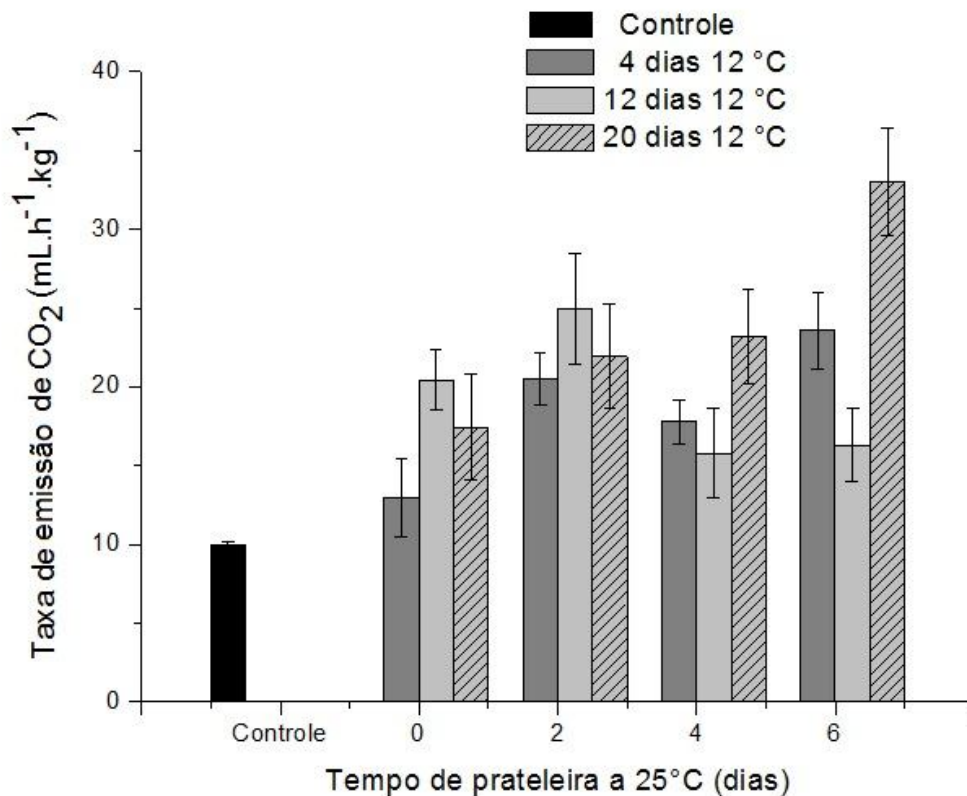


Figura 5. Taxa de emissão de CO<sub>2</sub> em frutos de mamão 'Golden' mantidos por 4, 12 e 20 dias sob baixa temperatura a 12°C, com amostragens aos 0, 2, 4 e 6 dias de prateleira a 25°C. O controle representa os frutos avaliados no primeiro dia de coleta. Barras verticais indicam o desvio padrão da média.

Estes resultados mostram que a emissão de etileno aumentou em relação ao controle, mas se manteve constante durante o período de prateleira à medida que a taxa respiratória foi reduzida quando os frutos foram mantidos por 12 dias armazenados sob refrigeração. Resultados similares foram verificados por Abou et al. (1975) e Souza et al., (2007), que observaram uma queda da taxa respiratória e da emissão de etileno no amadurecimento de frutos de mamão armazenados à baixa temperatura por períodos similares ao observado no presente trabalho. An e Paull (1990) observaram que mamões armazenados a 10°C por 14 dias amadureceram mais rapidamente quando expostos à temperatura ambiente. Dessa forma, é possível afirmar que as emissões de etileno e de CO<sub>2</sub> em frutos armazenados à baixa temperatura, respondem de

maneiras diferenciadas, podendo ocorrer aumento ou queda na emissão desses gases dependendo do tempo de exposição à baixa temperatura.

Conforme verificado pelo presente estudo, o emprego da baixa temperatura pode modificar a fisiologia do amadurecimento do mamão, variando de acordo com o tempo de exposição à temperatura baixa, podendo ocorrer várias transformações físico-químicas como a mudança da cor verde da casca (Figura 1 e Figura 2) e a rápida perda da firmeza da polpa (Figura 3), como foram demonstradas neste trabalho e nos relatos de An e Paull (1990).

Os resultados apresentados a seguir revelam que o aumento da atividade respiratória também é variável com o tempo de exposição à baixa temperatura e que rotas alternativas da respiração celular podem estar envolvidas neste processo, aumentando a respiração não fosforilativa e alterando o metabolismo dos frutos.

O isolamento e a purificação das mitocôndrias em *percoll*, na presença de BSA, permitiu a obtenção de mitocôndrias acopladas, com bons valores de controle respiratório, durante todo o tempo de armazenamento dos frutos. A Tabela 1 mostra as taxas de consumo de O<sub>2</sub> e o CR das mitocôndrias isoladas da polpa do mamão, ao longo do período de armazenamento. Os valores do CR variaram de 3,8 a 2,1, indicando que as preparações estavam boas, com bom nível de acoplamento das mitocôndrias na oxidação do malato e do glutamato (Duque e Arrabaça, 1999; Mariano et al., 2004; Pinheiro et al., 2004; Mariano et al., 2008).

No início do armazenamento, a taxa respiratória das mitocôndrias no estado 3 foi de 81,91 nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> e no estado 4 de 29,70 nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>. A tendência observada durante o período de prateleira dos frutos foi de aumento na taxa de consumo de O<sub>2</sub> das mitocôndrias, tanto na respiração sustentada pela síntese de ATP (estado 3), quanto na respiração de repouso (estado 4), quando os frutos foram armazenados a 12°C por 4 ou 12 dias (Tabela 1). Por outro lado, observou-se queda do consumo de O<sub>2</sub> das mitocôndrias isoladas da polpa dos frutos durante o período de prateleira, quando estes frutos foram armazenados por 20 dias a 12°C. Nestas condições, observa-se uma diminuição da taxa de consumo de O<sub>2</sub> de 148,0 nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> para 92,0 nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> no estado 3 e 48,0 nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> para 44,0 nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> no estado 4 entre o início e final do período de prateleira.



Neste trabalho não foi observada a ocorrência de um pico característico na taxa respiratória e na emissão de etileno dos frutos intactos (Figuras 4 e 5). Entretanto, houve um aumento da respiração que não foi uniforme, sendo variável de acordo com o tempo de exposição dos frutos à baixa temperatura. Nas mitocôndrias isoladas observou-se uma tendência de aumento da respiração similar àquela observada nos frutos intactos, apenas aos 4 dias de armazenamento sob baixa temperatura. Por outro lado, após 20 dias de armazenamento à baixa temperatura, enquanto a respiração do fruto intacto aumentou, ocorreu uma queda da respiração nas mitocôndrias isoladas, seguido por uma tendência de redução no nível de acoplamento das mitocôndrias, verificado pela redução nos valores do CR (Tabela 1). É provável que essa tendência observada esteja relacionada à ativação de rotas alternativas na CMTE (Mariano et al., 2004; 2008). Estes resultados são surpreendentes considerando que o mamão, como um fruto climatérico, se caracteriza por apresentar um aumento na taxa respiratória acompanhado de um pico na taxa de emissão de etileno, além de intensas transformações metabólicas durante a fase de amadurecimento (Paull et al., 1999; Chen e Paull, 2003; Silva et al., 2005; Azevedo et al., 2008), o que não foi observado ubiquamente no presente trabalho em todos os tempos de armazenamento.

Tabela1: Taxa de consumo de O<sub>2</sub> nos estados 3 e 4 e controle respiratório de mitocôndrias isoladas de polpa de mamão 'Golden' pré-armazenados por 4, 12 e 20 dias sob baixa temperatura a 12°C, com amostragens aos 0, 2, 4 e 6 dias de prateleira a 25°C.

Tempo de refrigeração a 12 °C (dias)	Tempo de prateleira a 25 °C (dias)	Taxa de consumo de O <sub>2</sub> (nmol O <sub>2</sub> min <sup>-1</sup> . mg <sup>-1</sup> )		
		Estado 3	Estado 4	CR
Controle	Controle	66,7 ± 8,0	24,4 ± 6,0	2,8 ± 0,3
	0	81,0 ± 9,1	29,0 ± 7,3	2,9 ± 0,4
4	2	71,0 ± 8,2	28,0 ± 6,3	2,6 ± 0,3
	4	130,0 ± 3,0	50,0 ± 7,0	3,8 ± 0,2
	6	112,0 ± 5,0	48,0 ± 5,0	2,4 ± 0,3
12	0	73,0 ± 1,2	33,0 ± 2,7	2,2 ± 0,1
	2	90,0 ± 3,6	36,0 ± 1,0	2,5 ± 0,1
	4	112,0 ± 1,0	54,0 ± 1,0	2,1 ± 0,1
20	6	129,0 ± 1,8	58,0 ± 1,0	2,2 ± 0,1
	0	148,0 ± 8,8	48,0 ± 2,8	3,1 ± 0,1
	2	133,0 ± 0,9	54,0 ± 1,0	2,5 ± 0,1
	4	104,0 ± 0,9	44,0 ± 0,5	2,4 ± 0,1
	6	92,0 ± 5,5	44,0 ± 0,9	2,1 ± 0,1

A atividade da via respiratória insensível ao cianeto, resultante da atividade da AOX, foi avaliada durante o amadurecimento dos frutos de mamão submetidos à baixa temperatura. A partir da taxa de consumo de oxigênio, foram determinadas estimativas da atividade da COX e da AOX, conforme apresentado na Figura 6. Os resultados mostraram que houve uma pequena redução da respiração pela via COX e um pequeno aumento da respiração pela via AOX do mamão após o armazenamento sob baixa temperatura, quando os mesmos foram transferidos para a temperatura ambiente. Cerca de 70% do consumo total de O<sub>2</sub> das mitocôndrias extraídas da polpa dos frutos foi devido à atividade da COX e o restante (30%) foi devido à AOX (consumo de oxigênio na presença de 3 mM de KCN (Figura 6)). Entretanto, quando o tempo de armazenamento refrigerado foi de 20 dias, houve uma queda do consumo O<sub>2</sub> pela via COX e subsequente aumento no consumo de O<sub>2</sub> em função da AOX (40%) no quarto dia de prateleira, quando comparado com o controle. Estes resultados confirmam os dados

apresentados na Tabela 1 que indicam menor acoplamento das mitocôndrias isoladas nos frutos armazenados por longos períodos, sugerindo a possível relação com o aumento da via AOX à semelhança do observado por Mariano et al. (2004; 2008), ativadas ou induzidas pela baixa temperatura (Ducet e Gauvrit 1977; Dizengremel et al., 1982; Duque e Arrabaça, 1999; Calegario et al., 2003; Pinheiro et al., 2004).

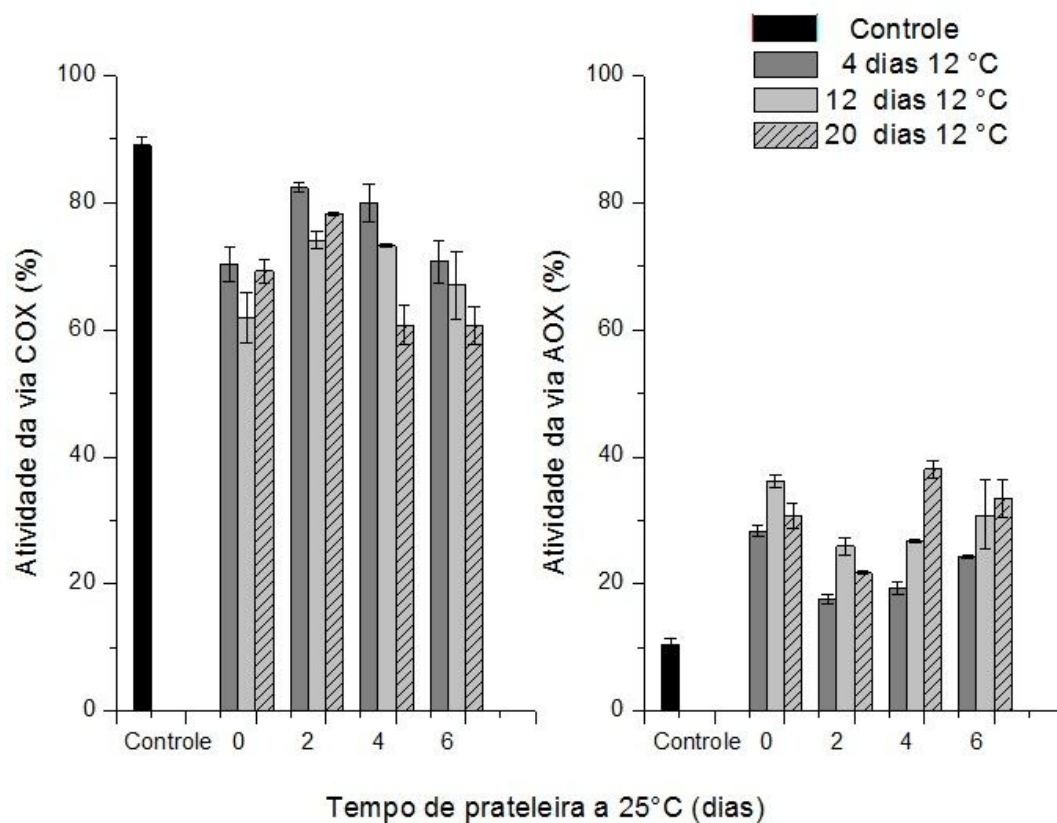


Figura 6. Atividade respiratória de mitocôndrias isoladas de polpa de frutos de mamoeiro 'Golden' armazenados por 4, 12 e 20 dias sob baixa temperatura a 12°C, com amostragens aos 0, 2, 4 e 6 dias de prateleira a 25°C. O controle representa os frutos avaliados no primeiro dia de coleta. Barras verticais indicam o desvio padrão da média.

Após verificar a participação efetiva da via resistente ao cianeto no consumo de  $O_2$ , buscou-se avaliar a capacidade máxima da oxidase alternativa. Para isso, otimizou-se o meio de reação conforme descrito em material e métodos. A atividade respiratória das mitocôndrias se mostra resistente ao cianeto, apresentando sua capacidade aumentada pelos ativadores. A partir

desses ensaios pode-se comprovar a atividade da AOX com adição do seu inibidor específico, n-propylgalato (Siedow e Girvin 1980; Onda et al 2008).

A Figura 7 mostra que a capacidade máxima da AOX das mitocôndrias dos frutos de mamão armazenados sob baixa temperatura por 20 dias, foi cerca de duas vezes maior que nas mitocôndrias dos frutos armazenados aos 4 e 12 dias, imediatamente após a retirada desses frutos do armazenamento refrigerado. A partir do segundo dia, observou-se aumento da capacidade desta via nos frutos armazenados por 4 e 12 dias, com aumentos, respectivos, de aproximadamente 55% e 40 % aos seis dias de prateleira. Estes dados indicam que a participação da via resistente ao cianeto no consumo total de O<sub>2</sub> em mitocôndrias isoladas foi estimulada com o amadurecimento do mamão, quando estes são submetidos à baixa temperatura por longo período de armazenamento (Figura 7).

A intensificação da via AOX deve ter sido a responsável pelo aumento da respiração nos frutos intactos e subsequente aumento na velocidade das transformações nos atributos de qualidade (Figuras 2 e 3), que resultam na depreciação dos frutos.

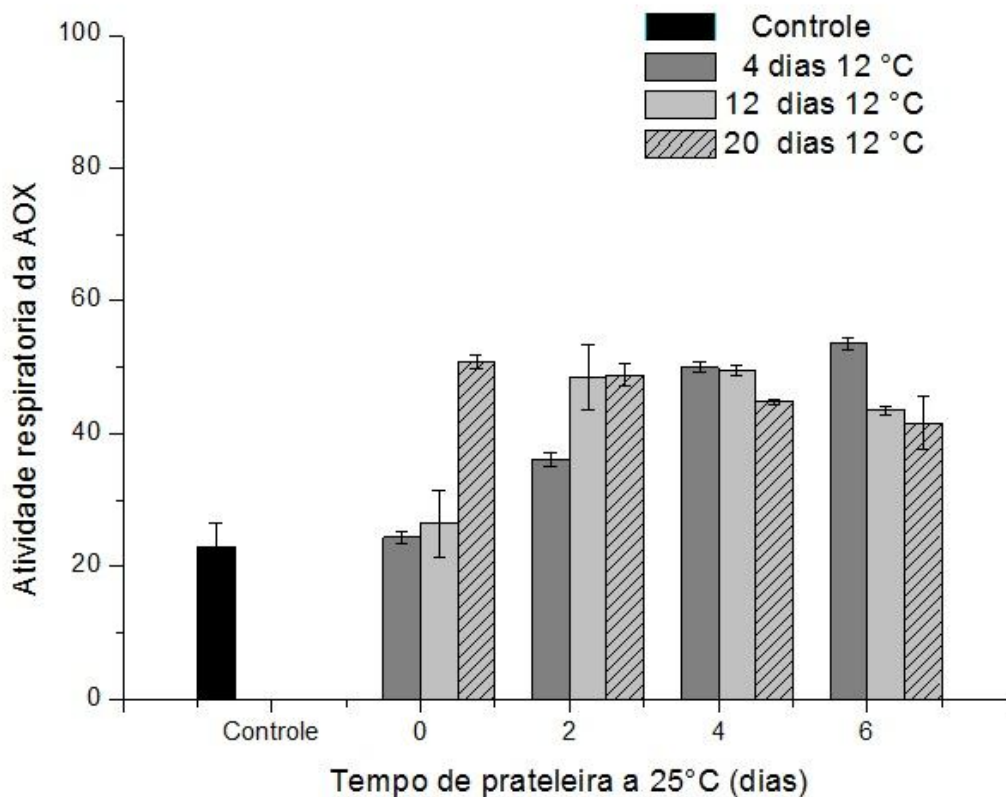


Figura 7. Atividade respiratória da oxidase alternativa em mitocôndrias isoladas de polpa de frutos de mamoeiro 'Golden' armazenados por 4, 12 e 20 dias sob baixa temperatura a 12°C, com amostragens aos 0, 2, 4 e 6 dias de prateleira a 25°C. Os valores são as médias  $\pm$  desvio padrão de três repetições, de três diferentes preparações mitocondriais.

O aumento da temperatura em frutos climatéricos durante o amadurecimento tem sido atribuído à atividade de AOX (Kumar e Sinha, 1992). Alguns trabalhos têm mostrado o aumento da via AOX durante o amadurecimento em frutos climatéricos (Duque e Arrabaça, 1999; Considine et al., 2001), respondendo de forma variável em função do tempo de exposição à baixa temperatura (Duque e Arrabaça, 1999; Holtzapffel et al., 2002). Esta resposta também tem sido relatada em tubérculos de batata (Caleario et al., 2003; Pinheiro et al., 2004). Segundo Dizengremel et al. (1982), a atividade AOX em tubérculos de batata, parece ser estimulada de maneira dependente do tempo de armazenamento, à semelhança do que foi observado no mamão (Figura 7), apresentando aumento na sua atividade, principalmente quando os frutos foram armazenados por longos períodos à baixa temperatura.

A atividade da UCP nas mitocôndrias isoladas da polpa do mamão foi investigada através do consumo de oxigênio e da determinação do potencial de membrana na presença de um indutor da atividade da proteína, o LA. A comprovação da atuação da UCP foi feita a partir da adição de seus inibidores, BSA e ATP, ao meio de reação contendo oligomicina e PG, respectivamente, inibidores da síntese de ATP e da atividade AOX. Os resultados indicam que, na presença do LA houve aumento da taxa respiratória e queda no potencial de membrana nas mitocôndrias dos frutos, em todas as amostragens realizadas (Tabelas 2 e 3).

A Tabela 2 mostra que houve um aumento na taxa respiratória das mitocôndrias isoladas dos frutos de mamão após a adição de 10 mM de LA, em todas as situações amostradas. Aos 4 dias de refrigeração o consumo de  $O_2$  foi de  $80 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ , na taxa respiratória inicial, para  $144 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  na taxa respiratória induzida pelo LA, imediatamente após a retirada da baixa temperatura, sem grandes alterações constantes até o período final do período de prateleira. Aos 20 dias de pré-refrigeração, verificou-se um incremento mais acentuado no consumo de  $O_2$ , tanto na taxa respiratória inicial que foi de  $81,8 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ , como na taxa respiratória induzida pelo LA que foi de  $200 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ , após 4 dias de prateleira (Tabela 2). Em praticamente todos os períodos de armazenamento a taxa respiratória inicial foi reduzida pela adição de BSA e ATP que atuaram como quelantes do LA.

Tabela 2. Consumo de O<sub>2</sub> de mitocôndrias isoladas de polpa de frutos de mamão 'Golden' pré-armazenados por 4, 12 e 20 dias sob baixa temperatura a 12°C, com amostragens ao 0, 2, 4 e 6 dias de prateleira a 25°C, em presença de ativadores e ou inibidores da UCP. Os dados se referem às médias ± desvio padrão de três diferentes preparações mitocondriais. '

Tempo de refrigeração a 12 °C (dias)	Tempo de prateleira a 25 °C (dias)	Taxa de consumo de O <sub>2</sub> (nmol O <sub>2</sub> min <sup>-1</sup> , mg <sup>-1</sup> )			
		Mito	Mito+LA	Mito+LA+BSA+ATP	Mito+LA+BSA+ATP+CCCP
Controle	Controle	88,0 ± 7,0	128,6 ± 8,0	48,3 ± 7,0	138,6 ± 8,0
	0	80,0 ± 6,0	144,1 ± 6,5	48,2 ± 6,8	148,0 ± 6,0
4	2	70,9 ± 12,0	146,5 ± 6,0	58,9 ± 8,0	172,3 ± 5,0
	4	69,4 ± 11,9	150,2 ± 7,0	53,1 ± 9,0	176,3 ± 6,5
	6	84,3 ± 5,8	153,5 ± 4,0	53,8 ± 4,5	193,4 ± 12,0
12	0	85,4 ± 4,0	148,3 ± 9,0	67,3 ± 10,0	100,3 ± 8,0
	2	85,1 ± 8,0	134,5 ± 12,0	51,3 ± 6,0	188,3 ± 7,0
	4	110,5 ± 7,0	151,3 ± 10,0	58,2 ± 6,0	104,7 ± 8,0
	6	90,9 ± 9,0	164,7 ± 5,0	54,9 ± 6,8	168,3 ± 8,0
20	0	81,8 ± 8,0	135,4 ± 9,0	60,0 ± 12,8	127,3 ± 6,0
	2	68,2 ± 7,0	175,4 ± 8,0	72,7 ± 8,6	175,4 ± 6,9
	4	108,2 ± 13,6	200,0 ± 14,0	80,0 ± 6,0	166,3 ± 14,4
	6	74,5 ± 12,4	140,0 ± 16,0	78,2 ± 14,7	109,1 ± 16,8

Na Tabela 3 observa-se uma redução no  $\Delta\Psi$ , nos frutos armazenados por 4 dias à baixa temperatura, diminuindo de 164,80 mV no estado 3 para 123,08 mV no tempo 0 de prateleira, após a adição do LA. Após 20 dias de armazenamento sob baixa temperatura a queda no  $\Delta\Psi$ , em função da adição de LA, foi de 175,49 mV para 118,69 mV, no tempo 0 de prateleira, enquanto no sexto dia de prateleira a queda foi de 181,58 mV para 125,88 mV. Esses dados mostram reduções no  $\Delta\Psi$  de 25%, 32% e 31%, respectivamente, como consequência da ativação da UCP pela adição do LA. Esta queda crescente no  $\Delta\Psi$  está associada ao aumento na atividade da UCP, evidenciando o progressivo desacoplamento das mitocôndrias com o amadurecimento do mamão (Tabelas 1, 2 e 3).

Como pode ser observado na Tabela 3, a adição de BSA e ATP ao meio de reação resultou em aumento no  $\Delta\Psi$  destas mitocôndrias, restaurando completamente ou suplantando o  $\Delta\Psi$  registrado antes da adição de LA. A recuperação do  $\Delta\Psi$  após a adição de BSA e ATP ocorreu em função da capacidade de energização da membrana ser restaurada pela inibição da UCP. Segundo Vercesi et al. (1995), o BSA assim como os nucleotídeos de purina (p.ex. ATP) são conhecidos inibidores da UCP, comprovando a participação dessa proteína na atividade respiratória durante o amadurecimento do mamão.

Estes dados mostram que durante os períodos mais longos de armazenamento do mamão houve aumentos mais expressivos na taxa respiratória e quedas no potencial de membrana com a participação da UCP (com a AOX inibida) (Tabelas 2 e 3), do que aqueles verificados apenas com a participação da AOX, quando a UCP estava inibida (Figura 6 e 7).



Tabela 3. Potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) de mitocôndrias isoladas de polpa de frutos de mamão 'Golden' pré-armazenados por 4, 12 e 20 dias sob baixa temperatura a 12°C, com amostragens ao 0, 2, 4 e 6 dias de prateleira a 25°C, em presença de ativadores e ou inibidores da UCP. Os dados se referem às médias  $\pm$  desvio padrão de três diferentes preparações mitocondriais.

Tempo de refrigeração a 12 °C (dias)	Tempo de prateleira a 25 °C (dias)	Potencial de membrana - $\Delta\Psi$ (mV)			
		Mito	Mito+LA	Mito+LA+BSA+ATP	Mito+LA+BSA+ATP+CCCP
Controle	Controle	163,70 $\pm$ 6,0	121,10 $\pm$ 7,5	150,70 $\pm$ 6,4	137,40 $\pm$ 5,0
	0	164,80 $\pm$ 6,0	123,08 $\pm$ 6,5	152,17 $\pm$ 6,8	140,49 $\pm$ 6,0
	4	166,52 $\pm$ 7,0	106,32 $\pm$ 6,0	166,32 $\pm$ 8,0	106,32 $\pm$ 5,0
	4	172,34 $\pm$ 6,9	122,45 $\pm$ 7,0	158,73 $\pm$ 9,0	125,88 $\pm$ 6,5
	6	169,10 $\pm$ 5,8	109,84 $\pm$ 4,0	169,10 $\pm$ 4,5	118,69 $\pm$ 7,0
12	0	162,67 $\pm$ 4,0	111,80 $\pm$ 9,0	158,73 $\pm$ 6,0	125,88 $\pm$ 8,0
	2	169,73 $\pm$ 4,0	118,80 $\pm$ 6,0	169,73 $\pm$ 8,0	118,80 $\pm$ 8,0
	4	172,34 $\pm$ 7,0	122,96 $\pm$ 8,0	172,34 $\pm$ 6,0	122,96 $\pm$ 8,0
	6	174,86 $\pm$ 9,0	111,82 $\pm$ 5,0	174,86 $\pm$ 6,8	124,54 $\pm$ 8,0
	0	175,49 $\pm$ 8,0	118,69 $\pm$ 9,0	158,73 $\pm$ 9,8	125,88 $\pm$ 6,0
20	2	175,49 $\pm$ 7,0	125,88 $\pm$ 8,0	158,72 $\pm$ 8,6	118,69 $\pm$ 9,0
	4	177,54 $\pm$ 3,6	114,54 $\pm$ 4,0	170,73 $\pm$ 6,0	114,54 $\pm$ 4,4
	6	181,58 $\pm$ 2,4	125,88 $\pm$ 6,0	178,73 $\pm$ 4,7	125,88 $\pm$ 6,8

Os resultados do presente trabalho indicam que o tempo de armazenamento à baixa temperatura pode ter estimulado a respiração induzida pelo LA, provavelmente, pelo efeito protonóforo deste ácido graxo que permite mostrar a possível ativação da UCP, levando a um desacoplamento da mitocôndria, resultando em menor resistência ao fluxo de elétrons na CMTE.

Na literatura alguns relatos mostram que o LA induz a atividade de UCP durante o amadurecimento de frutos de tomate (Almeida et al., 1999; Costa et al., 1999; Jarmuszkiewicz et al., 1999), através da interação com proteínas específicas da membrana mitocondrial, permitindo dessa forma a regulação da função mitocondrial. Segundo Jarmuszkiewicz et al. (1999), a indução da atividade da UCP pelo LA promove o desacoplamento de mitocôndrias de tomate, pelo aumento da condutância dos prótons da membrana e, conseqüentemente, aumento da reentrada destes na matriz mitocondrial.

Outros estudos também revelam a indução da síntese da UCP pela baixa temperatura em batata (Laloi et al., 1997, Nantes et al., 1999), em *Arabidopsis thaliana* (Maia et al., 1998) e inflorescência de couve (Ito, 1999), destacando o papel desta proteína na termogênese. É bem conhecido que, durante os períodos de aclimação ao frio, novas proteínas são formadas para a adaptação da planta ao ambiente (Kannerworff e van der Plas, 1994; Ito Inaba et al., 2009). Em batata, por exemplo, tem sido observado que a expressão da AOX e UCP é estimulada quando os tubérculos são armazenados à baixa temperatura (Zhou e Solomos, 1998; Nantes et al., 1999). Calegario et al. (2003), observaram que a expressão de UCP e AOX após 10 dias de armazenamento à baixa temperatura, aumentam simultaneamente com a respiração em tubérculos intactos. Segundo Duque e Arrabaça (1999), o aumento na respiração climatérica dos frutos de maçã sob baixa temperatura seria devido à ativação da AOX causada pelo frio.

Nossos resultados mostraram que a emissão de CO<sub>2</sub> durante pré-armazenamento do mamão à temperatura de 12°C por 20 dias aumentou consideravelmente, mas não apresentou pico climatérico característico. A atuação da AOX e UCP ocorreu paralelamente ao aumento na taxa respiratória. Dessa forma pode-se sugerir que ambas as proteínas AOX e UCP podem ter contribuído para o aumento da respiração dos frutos de mamão durante o seu amadurecimento, sendo estimuladas pela baixa temperatura de acordo com o

tempo de exposição, em consonância com o aumento da respiração observado nos frutos intactos.

Ambas as proteínas UCP e AOX são conhecidas por ter a expressão elevada sob condições de armazenamento sob baixa temperatura (Calegario et al., 2003). Mais estudos são necessários para determinar a ligação funcional entre os dois sistemas de dissipação de energia, envolvendo a UCP e a AOX, em mitocôndrias de plantas, especialmente durante o amadurecimento dos frutos sob refrigeração.

#### **4.2.4. Conclusão**

De modo geral, não foi observado um pico de produção de etileno e CO<sub>2</sub> nos frutos previamente refrigerados. Os resultados mostraram a participação da via resistente ao cianeto e da proteína desacopladora mitocondrial no aumento da atividade respiratória dos frutos, sendo variável com o tempo de exposição à refrigeração. Os resultados indicam que a maior participação da AOX e UCP ocorreu após 20 dias de refrigeração, em estreita relação com o aumento da taxa respiratória nos frutos intactos, ao contrário da emissão de etileno que apresentou tendência de queda após igual período de armazenamento. Dessa maneira, é possível afirmar que longos períodos de refrigeração podem afetar a taxa respiratória, na medida em que promovem estímulo da respiração no período de prateleira, afetando diretamente o produto na fase final de comercialização.

#### **4.2.5. Referências bibliográficas**

Abeles, F.B., Morgon, P.W., Saltveit Jr., M.E. 1992. Fruit ripening, abscission, and postharvest disorders. *In*: Abeles, F.B., Morgon, P.W., Saltveit Jr., M.E. (eds.) Ethylene in Plant Biology. 2nd edn. San diego, Academic Press, p. 414.

Abu-Goukh, A., Bashir, H. A. A. 2003. Changes in pectic enzymes and cellulase activity during guava fruit ripening. *Food Chem.* 83, 213-218.

Abou Aziz, A. B., El-Nabaawy, S. M. Zaki, H. A. 1975. Effect of different temperatures on the storage of papaya fruits and respirational activity during storage. *HortScience* 3, 173-177.

Almeida, A. M., Jarmuszkiewicz, W., Khomsi, H., Arruda, P., Vercesi, A. E., and Sluse, F. E. 1999. Cyanide-resistant, ATP-synthesis-sustained, and uncoupling-protein-sustained respiration during postharvest ripening of tomato fruit. *Plant. Physiol.* 119,1323–1329.

An, J.F., Paull, R.E. 1990. Storage temperature and ethylene influence on ripening of papaya fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115, 949-953.

Atkin, O.K., Tjoelker, M.G. 2003. Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. *Trends Plant Sci.* 8, 343-351.

Azevedo, I. G., Oliveira, J.G., Silva, M.G., Pereira, T., Correia, S.F., Vargas, H., Façanha, A. R. 2008. P-type H<sup>+</sup>-ATPases activity, membrane integrity, and apoplastic pH during papaya fruit ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 48, 242-247.

Balbino, J.M.S. Colheita, pós-colheita e fisiologia do amadurecimento do mamão. In: Martins, D.S., Costa, A.F.S. 2003. *A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção.* Vitória – ES.

Beavis, A.D., Vercesi, A.E. 1992. Anion uniport in plant mitochondria is mediated by a Mg<sup>2+</sup>-insensitive inner membrane anion channel. *J. Biol. Chem.* 267, 3079-3087.

Borecky, J., Vercesi, A.E. 2005. Plant Uncoupling Mitochondrial Protein and Alternative Oxidase: Energy Metabolism and Stress. *Biosci. Rep.* 25, 271-286.

Bradford, M. M. 1976. Microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-259.

Brandalise, M., Maia, I.G., Borecky, J., Vercesi, A.E., Arruda, P. 2003. Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35, 203–209.

Bron, I. U., Jacomino, A. P. 2009. Ethylene action blockade and cold storage affect ripening of Golden papaya fruit. *Acta Physiol. Plant.* 31, 1165-1173.

Calegario, F.F., Cosso, R.G., Fagian, M.M., Almeida, F.V., Jardim, W.F., Jezek, P., Arruda, P., Vercesi, A.E. 2003. Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35, 211–220.

Chen, N.J., Paull, R.E. 2003. Endoxylanase expressed during papaya fruit ripening: purification, cloning and characterization. *Functional Plant Biol.* 30, 433-441.

Chitarra, M.I.F.; Chitarra, A.B. 2005. *Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio*. 2<sup>o</sup> ed. Lavras: UFLA pp.98.

Considine, M.J., Daley, D.O., Whelan, J. 2001. The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango, *Plant Physiol.* 126, 1619-1629.

Corrêa, S.F., Batista Filho, M., Silva, M.G., Oliveira, J.G., Aroucha, E.M.M.; Silva, R.F.; Pereira, M.G.; Vargas, H. 2005. Effect of the potassium permanganate during papaya fruit ripening: ethylene production. *J. Phys. IV.* 125, 869-871.

Corrêa, S. F. Mota, L., Paiva, L. B., Couto, F. M., SILVA, M. G., Oliveira, J. G., Sthel, M. S., VARGAS, H. MIKLOS, A. 2011. Effects of ozone exposure on Golden papaya fruit by photoacoustic phase-resolved method: physiological changes

associated with carbon dioxide and ethylene emission rates during ripening. J. Appl. Phycol.. 109, 114701.

Costa, A.D.T., Nantes, I.L., Jezek, P., Leite, A., Arruda, P., Vercesi, A.E. 1999. Plant uncoupling mitochondrial protein activity in mitochondria isolated from tomatoes at different stages of ripening. J. Bioenerg. Biomembr. 31, 527-533.

Coultate, T.P. 2004. Alimentos: a química de seus componentes, 3<sup>o</sup> ed. Porto Alegre: Artimed, pp. 368

Cruz-Hernández, A., Gómez-Lim, M.A. 1995. Alternative oxidase from mango (*Magnifera indica* L.) is differentially regulated during fruit ripening. Planta .197, 569-576.

Day, D.A., Wiskich J.T. 1995. Regulation of alternative oxidase activity in higher plants. J. Bioenerg. Biomembr. 27, 379–385.

Dizengremel, P., Chauveau, M., Roussaux, J. 1982. Inhibition by adenine derivates of the cyanide-insensitive electron transport pathway of plant mitochondria. Plant Physiol. 70, 585-589.

Ducet, G., Gauvrit, C.1977. Induction de résistance au cyanure dans les mitochondries du tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum*). Physiol. Végét. 15, 145-152.

Duque, P., Arrabaça, J.D. 1999. Respiratory metabolism during cold storage of apple fruit. II. Alternative oxidase is induced at the climacteric. Physiol. Plant.107, 24-31.

Elthon, T.E., McIntosh, L. 1986. Characterization and solubilization of the alternative oxidase os *Sauromatum guttatum* mitochondria. Plant Physiol. 82, 1-6.

Fonseca, M. J. O, Leal, N. R., Cenci, S. A., Cecon, P. R., Bressan-Smith, R. E., Soares, A. G. 2006. Emissão de etileno e de CO<sub>2</sub> em mamão 'sunrise solo' e

'golden. Rev. Bras. Frutic. 28, 322-324.

Fonseca, M. J. O., Leal, N. R., Ceni, S. A., Cecon, P. R., Bressan-Smith, R. E., Balbino, J. M. S. 2007. Evolução dos pigmentos durante o amadurecimento de mamão 'Sunrise Solo' e 'Golden'. Rev. Bras. Frutic. 29, 451-455.

Fontes, R., V, Santos, M. P., Falqueto, A. R., Silva, D. M. 2008. Atividade da pectinametilesterase e sua relação com a perda de firmeza da polpa de mamão cv. Sunrise Solo e Tainung. Rev. Bras. Frutic. 30, 54-58.

Gomez, M., Lajolo, F. and Cordenunsi, B. 2002. Evolution of Soluble Sugars During Ripening of Papaya Fruit and its Relation to Sweet Taste. J. Food Sci. 67, 442–447.

González-Meler, M.A., Ribas-Carbo, M., Giles, L., Siedow, J.N. 1999. The effect of growth and measurement temperatura on the activity of the alternative respiratory pathway. Plant Physiol. 120, 765-772.

Hanqing, F., Kun, S., Mingquan, L., Hongyu, L., Xin, L., Yan, L., Yifeng, W. 2010. The expression, function and regulation of mitochondrial alternative oxidase under biotic stresses. Mol. Plant Pathol. 11, 429–440

Hiwasa, K., Kinugasa, Y., Amano, S., Hashimoto, A., Nakano, R., Inaba, A., Kubo, Y. 2003. Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit. J. Exp. Bot. 54, 771-779.

Hofman, P.J., Jobin-Décor, M., Meiburg, G.F., Macnish, A.J., Joyce, D.C. 2001. Ripening and quality responses of avocado, custard apple, mango and papaya fruit to 1-methylcyclopropene. Aust. J. Agric. Res. 41, 567-572.

Holtzapffel, R.C., Finnegan, P.M., Millar, A.H., Badger, M.R., Day, D.A. 2002. Mitochondrial protein expression in tomato fruit during on-vine ripening and cold storage, Funct. Plant Biol. 29, 827–834.

Ito-Inaba, Y., Sato, M., Masuko, H., Hida, Y., Toyooka, K., Watanabe, M., Inaba, T. 2009. Developmental changes and organelle biogenesis in the reproductive organs of thermogenic skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*). *J. Exp. Bot.* 60, 3909–3922.

Ito, K. 1999. Isolation of two distinct cold-inducible cDNAs encoding plant uncoupling proteins from the spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). *Plant Sci.* 149, 167-173.

Jarmuszkiewicz, W., Almeida, A.M., Sluse-Goffart, C.M., Sluse, F.E., Vercesi, A.E. 1999. Linoleic acid-induced activity of plant uncoupling mitochondrial protein in purified tomato fruit mitochondria during resting, phosphorylating, and progressively uncoupled respiration. *J. Biol. Chem.* 273, 34882–34886

Jezek, P., Costa, A.D.T., Vercesi, A.E. 1996. Evidence for aniontranslocating plant uncoupling mitochondrial protein in potato mitochondria. *J. Biol. Chem.* 271, 32743-32748.

Kamo, N., Hongoh, R., Kobatake, V. 1979. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenylphosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. Membr. Biol.* 49, 105-121.

Kadenbach, B., Ramzan, R., Wenb,L., Vogt, S. 2010. New extension of the Mitchell Theory for oxidative phosphorylation in mitochondria of living organisms. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* 1800, 205–212.

Kannerworff, W. A., Van der Plas, L. H. W. 1994. Respiration of bulb scale fragments of tulip after storage at 5°C . *Plant Sci.* 104, 31–38.

Kumar, S., Patil, B.C., Sinha, S.K. 1990. Cyanide resistant respiration is involved in temperature rise in ripening mangoes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 818-822



Kumar, S., Sinha, S.K. 1992. Alternative respiration and heat production in ripening banana fruits (*Musa paradisiaca* var. *Mysore Kadali*). J. Exp. Bot. 43, 1639-1642.

Laloi, M., Klein, M., Riesmeier, J.W., Röber, B.M., Fleury, C., Bouillaud, F., Ricquier, D. 1997. A plant cold-induced uncoupling protein. Nature. 389, 135-136.

Lazan, H., Ali, Z. M., Liang, K. M., Yee, K. L. 1989. Polygalacturonase activity and variation in ripening of papaya fruit tissue depth and heat treatment. Physiologia Plantarum. 77, 93-98.

Lima, L.C., Costa, S.M., Dias, M.S.C., Martins, R.N., Ribeirojúnior, P.M. 2005. Controle do amadurecimento de banana 'Prata-Anã' armazenada sob baixa temperatura e atmosfera modificada passiva com o uso do 1-Metilciclopropeno. Ciênc. Agrotec. 29, 476-480.

Maia, I.G., Benedetti, C.E., Leite, A., Turcinelli, S.R., Vercesi, A.E., Arruda, P. 1998. *AtUCP*: an *Arabidopsis* gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein. FEBS Lett. 429, 403-406.

Mariano, A.B., Kovalhuk, L., Valente, C., Maurer – Menestrina, J., Pereira – Netto, A.B., Guerra, M.P., Carnieri, E.G.S. 2004. Improved method for isolation of coupled mitochondria of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, Braz. Arch. Biol. Technol. 47, 873–879.

Mariano, A., Valente, C., Maurer, J., Cadena, S., Rocha, M., Deoliveira, M., Salgado, I. Carnieri, E. 2008. Functional characterization of mitochondria isolated from the ancient gymnosperm *Araucaria angustifolia*. Plant Sci. (Limerick). 175, 701-705.

Martins, I.S., Carnieri, E.G.S., Vercesi, A.E. 1993. Mechanisms of Ca<sup>2+</sup> and anion transport across the inner membrane of plant mitochondria. Curr. Top. Plant Physiol. 1, 211–217.

McGuire, R.G. 1992. Reporting of Objective Color measurements. Hort Sci. 27, 1254-1255.

Mendonça, K., Jacomino, A.P., Melhem, T.X., Kluge, R.A. 2003. Concentração de etileno e tempo de exposição para desverdecimento de limão 'Siciliano'. Braz. J. Food Technol. 6, 179-183.

Millar, A.H., Hoefnagel, M.H.N., Day, D.A., Wiskich, J.T. 1996. Specificity of the organic acid activation of alternative oxidase in plant mitochondria. Plant Physiol. 111, 613-618.

Moller, I.M. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 52, 561-591.

Moreau, F., Romani, R. 1982. Malate oxidation and cyanide-insensitive respiration in avocado mitochondria during the climacteric cycle. Plant Physiol. 70, 1385-1390

Nantes, I.L., Fagian, M.M., Catisti, R., Arruda, P., Maia, I.G., Vercesi, A. 1999. Low temperature and aging-promoted expression of UCP in potato tuber mitochondria. FEBS Lett. 457, 103-106.

Nunes, M.C.N., Emond, J.P. 2003. Storage temperature. **In.**: Bartz, J.A.; Brecht, J.K. (eds.) Postharvest physiology and pathology of vegetables. 2ed. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. pp. 209-228.

Oliveira, M.A.B., Vianni, R., Souza, G., Araújo, T.M.R. 2002. Caracterização do estágio de maturação do papaia 'Golden' em função da cor. Rev. Bras. Frut. 24, 559-561.

Oliveira, J.G., Vitoria, A.P. 2011. Papaya: nutritional and pharmacological characterization, and quality loss due to physiological disorders. An overview. Food Res. Int. 44, 1306-1313.

Onda, Y., Kato, Y., Abe, Y., Ito, T., Morohashi, M., Ito, Y., Ichikawa, M., Matsukawa, K., Kakizaki, Y., Kiowa, H., Ito, K. 2008. Functional coexpression of the mitochondrial alternative oxidase and uncoupling protein underlies thermoregulation in the thermogenic florets of skunk cabbage. *Plant Physiol.* 146, 636–645

Owino, W.O., Nakano, R., Kubo, Y., Inaba, A. 2004. Alterations in cell wall polysaccharides during ripening in distinct anatomical tissue regions of the fig (*Ficus carica* L.) fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 32, 67–77.

Paull, R.E., Chen, N.J. 1983. Postharvest variation in cell wall-degrading enzymes of papaya (*Carica papaya* L.) during fruit ripening. *Plant Physiol.* 72, 382-385.

Paull, R.E., Nishijima, W., Reyes, M., Cavaletto, C. 1997. Postharvest handling and losses during marketing of papaya (*Carica papaya* L.). *Postharvest Biol. Technol.* 11, 165-179.

Paull, R.E., Gross, K., Qiu, Y. 1999. Changes in papaya cell walls during fruit ripening, *Postharvest Biol. Technol.* 16, p. 79–89.

Paull, R. E., Chen, N. J. 2003. Postharvest variation in cell wall degrading enzymes of papaya (*Carica papaya* L.) during fruit ripening. *Plant Physiol.* 72, 382-385.

Pereira, T., Almeida, P.S.G., Azevedo, I.G., Cunha, M., Oliveira, J.G., Silva, M.G., Vargas, H. 2009. Gas diffusion in 'Golden' papaya fruit at different maturity stages. *Postharvest Biol. Technol.* 54,123-130.

Pinheiro, H. A., Borges, R., Silva, M. A. P., Centeno, D. C. 2004. Activity of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial protein in potato tubers stored at low temperature or submitted to artificial aging. *Braz. J. Plant Physiol.* 16, 69-76

Prates, R.S. 2005. Aspectos operacionais do programa de exportação do mamão brasileiro para os Estados Unidos: sete anos de sucesso. *In.*: Martins, D.S. Papaya Brasil. Mercado e Inovações Tecnológicas para o Mamão. Incaper, Vitória, ES. pp. 57-68.

Raskin, I., Turner, I.M., Melander, W.R. 1989. Regulation of heat production in the inflorescences of an *Arum* Lily by endogenous salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 2214-2218.

Rhodes, M.J.C., Wooltorton, L.S., Galliard, T., Hulme, A.C. 1970. Production of ethylene by whole apple fruits and by tissue slices and cell-free extracts prepared from fruit. *J. Exp. Bot.* 21, 40–48.

Rouet-Mayer, M.A., Valentova, O., Simond-Cote, E., Daussant, J., The´venot, C. 1995. Critical analysis of phospholipid hydrolyzing activities in ripening tomato fruits: study by spectrofluorimetry and high-performance liquid chromatography. *Lipids.* 30, 739–746

Saltveit, M.E. 1999. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 15, 279-292.

Siedow, J.N., Girvin, M.E. 1980. Alternative respiratory pathway. Its role in seed respiration and its inhibition by propyl gallate. *Plant Physiol.* 65, 669–674.

Siedow, J.N., Umbach, A.L. 1995. Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. *Plant Cell.* 7, 821–831

Siedow, J.N., Umbach, A.L. 2000. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1459, 432-439

Silva, M.G., Oliveira, J.G., Vitória, A.P., Correa, S.F., Pereira, M.G., Campostrini, E., Santos, E.O., Cavalli, A., Argas, H., 2005. Correlation between ethylene

emission and skin colour changes during papaya (*Carica papaya* L.) fruit ripening. J. Phys. IV. 125, 877–879.

Sluse, F.E, Almeida A.M., Jarmuszkiewicz, W., Vercesi, A.E. 1998. Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. Biochem. Biophys. Acta. 1365, 319-327.

Solomos, T., Laties, G.G. 1974. Similarities between the actions of ethylene and cyanide in initiating the climacteric and ripening of avocados. Plant Physiol. 54, 506-511

Souza, M. S., Corrêa, S. F., Silva, M. G., Vargas, H., Oliveira, J. G. 2007. Alterações no padrão respiratório em frutos de mamão (*Carica papaya* L.) 'Golden' associados ao amadurecimento à baixa temperatura. In: III Simpósio do Papaya Brasileiro, Vitória - ES. Papaya Brasil: manejo, qualidade e mercado do mamão.

Souza, M. S., Azevedo, I. G.; Corrêa, S. F.; Silva, M. G., Pereira M. G., Oliveira, J. G. 2009. Resposta da aplicação do 1-MCP em frutos de mamoeiro 'Golden' em diferentes estádios de maturação. Rev. Bras. Frutic. 31, 693-700.

Thumdee, S., Manenoi, A., Chen, N.J., Paull, R.E. 2010. Papaya fruit softening: role of hydrolases. Trop. Plant Biol. 3, 98-109.

Umbach, A.L., Siedow, J.N. 1993. Covalent and noncovalent dimmers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. Plant Physiol. 103, 845–54.

Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L. 1992. Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. Plant Physiol. 100, 115-119.

Vanlerberghe, G.C., McIntosh., L. 1997. Alternative oxidase: from gene to function. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. 48, 703-734.

Vercesi, A.E., Martins, I.S., Silva, M.A.P., Leite, H.M.F., Cuccovia, I.M. 1995. UCPing plants. *Nature*. 375, 24.

Vercesi, A.E., Jezek, P., Costa, A.D.T., Kowaltovski, A.J., Maia, I.G., Arruda, P. 1998. A plant uncoupling mitochondrial protein. In: *Plant mitochondria: from gene to function*, Backhuys Publishers, Leinden, Netherlands. pp.435-440.

Vercesi, A.E. 2001. The discovery of an uncoupling mitochondrial protein in plants. *Biosci Rep*. 21, 195-200.

Vercesi, A.E., Borecký, J., Maia, I.G., Arruda, P., Cuccovia, I.M., Chaimovich. 2006. Plant Uncoupling Mitochondrial Proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 57, 383- 404.

Xu, F., Zhang, D.-W., Wang, J.-H., Zhang, Z.-W., Wen, L., Du, J.-B., Shang, J., Yuan, M., Yuan, S. Lin, H.-H. (2011) *N*-Propyl Gallate Is An Inhibitor To Tomato Fruit Ripening. *J. Food Biochem.* doi: 10.1111/j.1745-4514

Zhou, D., Solomos, T. 1998. Effect of hypoxia on sugar accumulation, respiration, activities of amylase and starch phosphorylase, and induction of alternative oxidase and acid invertase during storage of potato tubers (*Solanum tuberosum* cultivar Russet Burbank) at 1°C. *Physiol. Plant*. 104, 255-265.

Wagner, A.M., Van Der Bergen, C.W.M., Wincencjusz, H. 1995. Stimulation of the alternative pathway by succinate and malate. *Plant Physiol*. 108, 1035–1042.

Wills, R.B.H., Widjanarko, S.B. 1995. Changes in physiology, composition and sensory characteristics of Australian papaya during ripening. *Aust. J. Exp. Agric.* 35, 1173–1176

Yang, S.F. 1985. Biosynthesis and action of ethylene. *HortScience*. 20, 41-45.

#### 4.2.6 Considerações Finais

O Presente trabalho fornece estimativas sobre a participação da oxidase alternativa e da proteína desacopladora em mitocôndrias isoladas de polpa de fruto de mamão no processo de amadurecimento dos frutos.

Durante o trabalho foi possível estabelecer um protocolo de extração de mitocôndrias isoladas da polpa dos frutos de mamão, o que permitiu investigar algumas particularidades da fisiologia da mitocôndria no tecido específico, fornecendo subsídios para ajudar a esclarecer algumas características do funcionamento de rotas alternativas da respiração em estreita relação com as transformações físico-químicas, na emissão de gases e na taxa respiratória destes. Essas mudanças foram variáveis em função da temperatura e do tempo de exposição à mesma.

Foi investigado o efeito da baixa temperatura ao longo do tempo e os resultados indicam que a maior participação da oxidase alternativa e da proteína desacopladora ocorreu após períodos mais longos de refrigeração, em estreita relação com o aumento da taxa respiratória nos frutos intactos, ao contrário da emissão de etileno que apresentou tendência de queda em igual período de armazenamento. Dessa maneira, é possível afirmar que longos períodos de refrigeração podem afetar a taxa respiratória na medida em que promovem um estímulo da respiração no período de prateleira, afetando diretamente o produto na fase final de comercialização.

#### 4.2.7 Referências bibliográficas

Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit Jr., M.E. 1992. *In*. Ethylene in Plant Biology. *Academic Press*, San Diego. 414p

Ali, Z.M., Lazan, H. 1998. *In*: Shaw, P.E., Chan, H.T. Jr., Nagy, S. Tropical and subtropical fruits. Florida, *AGScience Inc.*, p. 401-445

Almeida A.M, Navet R., Jarmuszkiewicz W., Vercesi A.E, Sluse-Goffart M.C, Sluse F.E. 2002. The energy-conserving and energy-dissipating processes in mitochondria isolated from wild type and nonripening tomato fruits during development on the plant. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 34:487–498.

Almeida, R. F., Martins, M. L. L., Resende, E. D., Vitorazi, L., Carlos, L. A., Pinto, L. K. A. 2006. Influência da temperatura de refrigeração sobre as características químicas do mamão cv. "Golden". *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 26(3): 577-581.

A.O.A.C - Association of Official Analytical Chemists. (1970) Official Methods of Analyses of the. (11ed). Washington, 1015p.

Assis, J.S. 2005. Transporte marítimo de papaya – viabilidade dos contêineres.



In.: Martins, D.S. (Ed.) Papaya Brasil. Mercado e Inovações Tecnológicas para o Mamão. Vitória-ES: INCAPER, p. 93-100.

Awad, M. 1993. Fisiologia pós-colheita de frutos. (1Ed). São Paulo, Nobel, 114p.

Bapat, V.A., Trivedi, P.K., Ghosh, A., Sane, V.A., Ganapathi, T.R., Nath P. 2010. Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnol Adv.* 28(1): 94-107.

Balbino, J. M.S., Costa, A. F. S. 2003. Crescimento e desenvolvimento dos frutos do mamoeiro do 'Grupo Solo' e padrão de qualidade. In: Martins, D. S., Costa, A. F. S. A cultura do mamoeiro: Tecnologias de Produção. Vitória-ES: INCAPER, p.389-402

Berilli, S.S., Oliveira, J.G., Marinho, A.B., Lyra, G.B., Souza, E.F., Viana, A.P., Bernardo, S., Pereira, M.G. (2007) Avaliação da taxa de crescimento de frutos de mamão (*Carica papaya* L.) em função das épocas do ano e graus-dias acumulados. *Rev. Bras. Frut.* 29(1):11-14.

Birth, G.S., Dull, G.G., Magee, J.B., Chan, H.T., Cavaletto, C.G. 1984. An optical method for estimating papaya maturity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, 109: 62-66.

Bouzayen, M., Latché, A., Nath, P., Pech, J.C. 2009. Mechanisms of fruit ripening. In. *Plant Developmental Biology– Biotechnological Perspectives*. 1:319-339.

Cara, B., Giovannoni, J.J. 2008. Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Science*, 175 (2): 106-113.

Chaves, A. L. S., Mello-Farias, P. C. 2006. Ethylene and fruit ripening: from illumination gas to the control of gene expression, more than a century of discoveries. *Genetics and Molecular Biology*. 29 (3):508-515.

Chan Jr., H.T., Hibbard, K.L., Goo, T., Akamine, E.K. 1979. Sugar composition of papayas during fruit development. *Hortscience*, 14(2):140-141.

Considine, M.J., Holtzapffer, R.C., Day, D.A., Whelan, J., Millar, A.H. 2002. Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. *Plant Physiol.* 129, 949–953.

Copeland, W.C. 2002. *Mitochondrial DNA: methods and protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, Methods in Molecular Biology.197: 420.

Coultate, T.P. 2004. *In.: Alimentos. A química de seus componentes*. (3ed). 368p.

Cruz-Hernández, A., Gómez-Lim, M.A. 1995. Alternative oxidase from mango (*Mangifera indica* L.) is differentially regulated during fruit ripening. *Planta* 197:569-576.

D'innocenzo, M. 1996. Comportamento de enzimas da parede celular e textura da polpa relacionados ao tratamento de irradiação de mamões. (*Carica papaya* L. cv. Solo) durante o amadurecimento. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 85p.

Draetta, I.S., Shimokomaki, M., Yokomizo, Y., Fujita, J.T., Menezes, H.C., Bleinroth, E.W. 1975. Transformações bioquímicas do mamão (*Carica papaya*) durante a maturação. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, Campinas. 6: 395-408.

Elthon, T.E., McIntosh, L. 1986. Characterization and solubilization of the alternative oxidase of *Sauromatum guttatum* mitochondria. *Plant Physiol.* 82:1-6.

Fabi, J.P., Cordenunsi, B.R., Mattos Barreto, G. P., Mercadante, A.Z., Lajolo, F. M., Oliveira Do Nascimento, J.R. 2007. Papaya fruit ripening: response to ethylene and 1-ethylcyclopropene (1-MCP). *J Agric Food Chem.* 55:6118–6123.

FAOSTAT. Estatística do Fundo das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. Disponível em <www.fao.org>. Acesso em 10-12-2012 página mantida pela FAO

Ferguson, I., Volz, R., Woolf, A. 1999. Preharvest factors affecting physiological disorders of fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 15:255-262.

Genevois, M.L. 1929. Sur la fermentation et sur la respiration chez les végétaux chlorophylliens. *Revue Génétique Botanique*, 41: 252-271.

Gomez, M.L.P.A., Lajolo, F.M., Cordenunsi, B.R. 1999. Metabolismo de carboidratos durante o amadurecimento do mamão (*Carica papaya* L. cv. Solo): influência da radiação gama. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 19(2):246-252.

Gomez, M. L. P. A., Lajolo, F. M., Cordenunsi, B. R. 1999. Metabolismo de carboidratos durante o amadurecimento do mamão (*Carica papaya* L. Cv. Solo): influência da radiação gama. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 19(2):246-252.

Grant. N., Onda, Y., Kakizaki, Y., Ito. K., Watling, J., Robinson, S. 2009. Two Cys or Not Two Cys? That Is the Question; Alternative Oxidase in the Thermogenic Plant Sacred Lotus *Plant Physiology*, 150(2): 987 - 995.

Grierson, D. 1998. Manipulation of fruit ripening by genetic modification. *In*: Lindsey, K. Transgenic plant research. Durham: CRC Press, p. 109-124.

Hiwasa, K., Kinugasa, Y., Amano, S., Hashimoto, A., Nakano, R., Inaba, A., Kubo, Y. 2003. Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit. *J. Exp. Bot.* 54(383):771-779.

Holtzapffel, R.C., Finnegan, P.M., Millar, A.H., Badger, M.R., Day, D.A. 2002. Mitochondrial protein expression in tomato fruit during on-vine ripening and cold storage. *Funct. Plant Biol.* 29:827-834.

Huq, S., Palmer J.M. 1978. Isolation of a cyanide-resistant duroquinol oxidase from *Arum maculatum* mitochondria. *FEBS Letters*, 95:217-220.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estados. Disponível em <[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)>. Acesso em 15-02-2012 página mantida pelo IBGE.

IBRAF (2012) – Instituto Brasileiro de Frutas - [http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est\\_frutas.asp](http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp). Acesso em 03-03-2012 página mantida pelo IBRAF.

Ito-Inaba, Y., Hida, Y., Mori, H., Inaba, T. 2008. Molecular Identity of Uncoupling Proteins in Thermogenic Skunk Cabbage *Plant Cell Physiol.*, 49(12):1911-1916.

Jacomino, A. P., Bron, L. U., Kluge, R. A. 2003. Avanços em tecnologia pós-colheita de mamão. *In: MARTINS, D. S. Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno. Vitória-ES: INCAPER, p. 283-293.*

Jain, N., Dhawan, K., Malhotra, S., Singh, R. (2003) Biochemistry of fruit ripening of guava (*Psidium guajava* L.): Compositional and enzymatic changes. *Plant Foods for Human Nutrition*. 58:309-315.

Jezek, P., Costa, A.D., Verceis, A.E. 1996. Evidence for anion-translocating plant uncoupling mitochondrial protein in potato mitochondrial. *J. Biol. Chem.* 271: 32743-32748.

Jezek, P., Engstova, H., Zackova, M., Vercesi, A.E., Costa, A.D., Arruda, P., Garlid, K.D. 1998. Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1365:319–327

Kader, A.A. Papaya. Disponível em <<http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Fruit/papaya>>. Acesso em 20-02-2010 página mantida pela Postharvest Thecnology.

Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R., Kobatake, J. 1979. Membrane potential of mitochondria measured with of electrode sensitive to tetraphenil phosphonium and

relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *Journal of Membrane Biology*. 49:105-121.

Kays, S.J. 1994. Postharvest physiology of perishable plant products. *Book News*. Portland, Oregon. 532p.

Kowaltowski, A.J., Costa, A.D.T., Vercesi, A.E. 1998. Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. *FEBS Letters*. 425: 213–216.

Kumar, S., Sinha, S.K. 1992. Alternative respiration and heat production in ripening banana fruits (*Musa paradisiaca* var. *Mysore Kadalì*). *J. Ex. Bot.* 43:1639-1642.

Kumar, S., Patil, B.C., Sinha, S.K. 1990. Cyanide resistant respiration is involved in temperature rise in ripening mangoes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168:818-822

Laloi, M., Klein, M., Riesmeier, J.W., Muller–Rober, B., Fleury, C., Bouillaud, F., Ricquier, D. 1997. A plant cold–induced uncoupling protein. *Nature*, 389:135–136.

Lance, C. 1972. La respiration de l'*Arum maculatum* au cours du développement de l'inflorescence. *Annales des Sciences Naturelles Botaniques*, 12:477-495.

Lazan, H., Ali, Z.N., Liang, K.S., Lee, K.L. 1989. Polygalacturonase activity and variation in ripening of papaya fruit with tissue depth and heat treatment. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen. 77:93-98.

Lazan H., Selamat, M.K., Ali, Z.M. 1995.  $\beta$ -galactosidase, polygalacturonase and pectinesterase in differential softening and cell wall modification during papaya fruit ripening. *Physiol. Plant.* 95:106-112.

Lopes, B. F., Soprani, J., Gallon, C. Z. 2005. Atividade da enzima poligalacturonase durante o amadurecimento do mamão (*Carica papaya* L.) cv. Golden e Gran Golden. *In*: MARTINS, D.S. Papaya Brasil. Vitória: Incaper,

Luethy, M.H., Hayes, M.K., Elthon, T.E. 1991. Partial purification and characterization of three NAD(P)H dehydrogenases from *Beta vulgaris* mitochondria, *Plant Physiol.* 97:1317–1322.

Macedo, D. V., Ferraz, V. L., Pereira Da Silva, L., Vercesi, A. E. 1988. Ca<sup>+2</sup> dependent NAD(P)+induced alterations in membrane permeability of rat liver mitochondria. Integration of Mitochondrial Function, Ed. J. Lemasters, Plenum, New York, p. 535-542.

Maia, G. A., Sousa, P. H. M., Lima, A. S., Carvalho, J. M., Figueiredo, R. W. 2009. Processamento de frutas tropicais: nutrição, produção e controle de qualidade. UFC: Fortaleza. 277p.

Manrique, G.D., Lajolo, F.M. 2004. Cell-wall polysaccharide modification during postharvest ripening of papaya fruit (*Carica papaya* L.). *Postharvest Biol. Technol.* 33: 11-26.

Medeiros, J.F., Oliveira, F.A. 2007. Fertirrigação da cultura do Mamoeiro. *In* Martins, D. S., Costa, A.N., Costa, A. F. S. Papaya Brasil: Manejo, qualidade de mercado do mamão. Vitoria : Incaper. p. 575-578

Meeuse B.J.D. 1975. Thermogenic respiration in Aroids. *Annual Review of Plant Physiology*, 26:117-126.

Millar, A. H., Liddell, A., Leaver C. J. 2007. Isolation and Subfractionation of Mitochondria from Plants. *In* METHODS IN CELL BIOLOGY, Elsevier Inc.Cap. 80:65-68

- Moller, I.M. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:561-591
- Moreau, F., Romani, R. 1982. Malate oxidation and cyanide-insensitive respiration in avocado mitochondria during the climateric cycle. *Plant Physiol.* 70:1385-1390.
- Nicholls, D.G.; Åkerman, K. E. O. 1982. Mitochondrial calcium transport. *Biochim iophys Acta*, 683:57-88.
- Oliveira, J. M. C., Alcantara, A. P. 2008. Frutas da Bahia Desempenho e Perspectiva. In *Bahia Agríc.*, 8(2): 1-9.
- Paull, R.E. 1993. Pineapple and papaya. In: Seymour, G.B.; Taylor, J.E.; Tucher, G.A. (Ed). *Biochemistry of fruit ripening*. London: Chapman e Hall, p.291-323.
- Paventi, G., Pastore, D., Bobba, A., Pizzuto, R., Di Pede, S., Passarella, S. 2006. Plant uncoupling protein in mitochondria from aged dehydrated slices of Jerusalem artichoke tubers become sensitive to superoxide and to hydrogen peroxide without increase in protein level. *Biochimie*, 88:179–188.
- Purvis, A.C. 1988. Limitation of Alternative Respiratory Pathway Activity in Grapefruit Flavedo Tissue by Oxygen Availability. *Plant Physiol.* 86(2):623-625.
- Rasmusson, A.G., and Moller, I.M. 1991. Effect of calcium ions and inhibitors on internal NAD(P)H dehydrogenases in plant mitochondria. *Eur J Biochem* 202, 617-623.
- Rasmusson, A.G., Soole, K.L., and Elthon, T.E. 2004. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annu Rev Plant Biol.* 55, 23-39.
- Ricquier, D., Kader, J.C. 1976. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium-dodecyl sulfate-polyarylamide gel eletrophoretic study. *Biochem Biophys.* 73:577–83.

Rich. P.R. 1978. Quinol oxidation in *Arum maculatum* mitochondria and its application to the assay, solubilisation and partial purification of the alternative oxidase. *FEBS Letters*, 96:252-256.

Roberts, M., Minott, D. A., Tennant, P. F., Jackson, J. C. 2008. Assessment of compositional changes during ripening of transgenic papaya modified for protection against papaya ringspot virus. *J. Sci. Food. Agric.* 88:1911-1920.

Rossetto, M. R. M., Nascimento, J. R. O., Purgatto, E., Fabi, J. P., Lajolo, F. M., Cordenunsi, B. R. 2008. Benzylglucosinolate, benzylisothiocyanate, and myrosinase activity in Papaya fruit during development and ripening. *J. Agric. Food Chem.* 56:9592-9599.

Ruggiero, C., Durigan, J.F., Goes, A., Natale, W. Benassi, A.C. 2003. Panorama da cultura do mamão no Brasil e no Mundo: situação atual e tendências. *In: Papaya Brasil: qualidade do mamão para o Mercado interno.* Vitória-ES, INCAPER. 728p.

Salomão, L. C. C., Siqueira, D. L., Santos, D., Borba, A. N. 2007 Cultivo do mamoeiro. Viçosa: (Ed). UFV, 73 p.

Sams, C.E. 1999. Preharvest factors affecting postharvest texture. *Postharvest Biol. Technol.* 15:249-254

Sampaio, V. R. 1993. Controle de pos-colheita das podridões de manga "Burbons" conservadas em câmara fria. *Anais da ESALQ*, 40:519-527.

Sluse, F.E., Jarmuszkiewicz, W. 2000. Activity and functional interaction of alternative oxidase and uncoupling protein in mitochondria from tomato fruit. *Braz. J. Med Biol. Res.*, 33:259-268.

Seymour R.S., Gibernau M., Ito K. 2003. Thermogenesis and respiration of inflorescences of the dead horse arum, *Heliconia muscivora*, a pseudo-thermoregulatory aroid associated with fly pollination. *Funct Ecol.* 17: 886–894



Shiga, T. M., Fabi, J. P., Nascimento, J. R. O., Petkowicz, C. L. O., Vriesmann, L. C., Lajolo, F. M., Cordenunsi, B. R. 2009. Changes in cell wall composition associated to the softening of ripening papaya: evidence of extensive solubilization of large molecular mass galactouronides. *J. Agric. Food Chem.* 57:7064-7071.

Silva, M.G., Santos, E.O., Sthel, M.S., Cardoso, S.L., Cavalli, A., Monteiro, A.R., Oliveira, J.G., Pereira, M.G., Vargas, H. 2003. Effect of heat treatment on ethylene and CO<sub>2</sub> emissions rates during papaya (*Carica papaya* L.) fruit ripening. *Review of Scientific Instruments.* 74(1):703-705

Solomos, T., Laties, G.G. 1974. Similarities between the actions of ethylene and cyanide in initiating the climacteric and ripening of avocados. *Plant Physiol.* 54:506-511.

Sweetlove, L.J., Lytovchenko, A., Morgan, M., Nunes-Nesi, A., Taylor, N.L., Baxter, C.J., Eickmeier, I., Fernie, A.R. 2006. Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:19587–19592.

Umbach, A.L., Siedow, J.N. 1993. Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. *Plant Physiol.* 103:845-854.

Vanlerberghe, G.C., Mcintosh, L. 1992. Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. *Plant Physiol.* 100:115-119.

Vanlerberghe, G.C., Mcintosh, L. 1997. Alternative oxidase: from gene to function. *Plant Physiol. Mol. Biol.* 48:703-734.

Vercesi, A.E., Martins, I.S., Silva, M.A.P., Leite, H.M.F., Cuccovia, I.M. And Chaimovich, H. 1995. Pumping Plants. *Nature*, 375: 24.

Vercesi, A.E.; Jeseck, P.; Costa, A.D.T.; Kowaltovski, A.J.; Maia, I.G. And Arruda, P. 1998. A plant uncoupling mitochondrial protein. *In* Plant mitochondrial: from gene to function, Backhuys Publisher, Leinden, Netherlands, p. 435-440.

Vercesi, A.E, Boreck'Y, J, Maia, I.G., Arruda, P, Cuccovia, I.M., Chaimovich, H. 2006. Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annu Rev Plant Biol.* 57:383–404.

Voesenek, L.A.C.J., Banga, M., Rijnders, J.H.G.M., Visser, E.J.W., Harren, F.J.M., Brailsford, R.W., Jackson, M.B., Blom, C.W.P.M. 1997. Laser-driven photoacoustic spectroscopy: What we can do with it in flooding research. *Annals of Botany.* 79: 57-65.

Yamanishi, O. K., Fagundes, G. R.; Machado Filho, J. A. 2005. Comportamento da maturação de mamão Tainung 1 cultivado em Brasília-DF. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP*, 27(2):314-316.

Yang, S.F.; Hoffman, N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, Standford, 35:155-189.

Zagory, D., Kader, A.A. 1989. Quality maintance in fresh fruits and vegetables by controlled atmospheres. *In*: JEN, J.J. Quality factors of fruits and vegetable: chemistry and technology. Washington: American Chemical Society, 14:174-178.

Watling, J.R., S.A. Robinson, R.S. Seymour. 2006. Contribution of the alternative pathway to respiration during thermogenesis in flowers of the sacred lotus. *Plant Physiology* 140: 1367-1373.