Enzimas antioxidantes em frutos com diferentes padrões de amadurecimento

Evellyn Couto Oliveira Resende

Campinas (SP) 2010

INSTITUTO AGRONÔMICO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL

ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM FRUTOS COM DIFERENTES PADRÕES DE AMADURECIMENTO

EVELLYN COUTO OLIVEIRA RESENDE

Orientadora: Ilana Urbano Bron

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical, Área de Concentração em Tecnologia da Produção Agrícola.

Campinas, SP
Abril 2010

Ficha elaborada pela bibliotecária do Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agronômico

R433e Resende, Evellyn Couto Oliveira
Enzimas antioxidantes em frutos com diferentes padrões de Amadurecimento / Evellyn Couto Oliveira. Campinas, 2010. 67 fls.

Orientadora: Ilana Urbano Bron
Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico

1. Frutos 2. Frutos – respiração 3. Etileno 4. Frutos - estresse oxidativo 5. *Carica papaya* 6. *Fragaria x ananassa* I. Bron, Ilana Urbano III. Título

CDD. 634.6

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA
DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO AGRONÔMICO
Pós-Graduação
Av. Barão de Itapura 1481 Caixa Postal 28
13001-970 Campinas, SP - Brasil
(019) 3231-5422 ramal 194
pgiac@iac.sp.gov.br

INSTITUTO AGRONÔMICO

Curso de Pós-Graduação

Agricultura Tropical e Subtropical

Certificado de Aprovação

Título: **Enzimas antioxidantes em frutos com diferentes padrões de amadurecimento**

Aluna: **Evellyn Couto Oliveira**

Área de Concentração: **Tecnologia da Produção Agrícola**

Processo SAA nº: **12162/08**

Orientadora: **Dra. Ilana Urbano Bron**

Aprovado pela Banca Examinadora:

Dra. Ilana Urbano Bron - IAC

Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres - ESALQ

Dra. Patrícia Cia - IAC

Campinas, 27 de abril de 2010

Visto:

Adriana Parada Dias da Silveira
Coordenadora
Pós-Graduação Instituto Agronômico

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar a oportunidade de viver, por me proporcionar momentos felizes e por me fazer crescer em momentos difíceis.

À minha orientadora Ilana Urbano Bron por sua paciência e dedicação, por quem tenho enorme carinho e respeito. Obrigada por tudo.

À amiga Paula Fabiane Martins, que me ajudou na realização dos meus experimentos e compartilhou comigo ensinamentos e experiências. Valeu, Paula!

Aos professores Ricardo Antunes de Azevedo e Ângelo Pedro Jacomino que gentilmente me cederam as instalações de seus laboratórios para que os meus experimentos fossem realizados.

Ao meu pai, minha mãe e minhas irmãs que sempre me ampararam e me incentivaram, acreditando em mim sempre.

Ao meu marido Paulo Alves Resende pelo seu amor, carinho, compreensão e ajuda durante todo esse período. Obrigada sempre!

À CAPES e FAPESP pela concessão da bolsa de estudo.

Aos amigos, professores e funcionários do IAC que tive oportunidade de conhecer durante o mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS..... v
LISTA DE FIGURAS..... vi
RESUMO..... ix
ABSTRACT..... xi
1 INTRODUÇÃO..... 01
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 02
2.1 Amadurecimento e Senescência..... 02
2.2 Estresse Oxidativo..... 06
2.2.1 Ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$)..... 07
2.2.2 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)..... 08
2.2.3 Radical hidroxila ($OH^{\bullet}$)..... 09
2.3 Sistema Antioxidante..... 09
2.3.1 Superóxido dismutase (SOD)..... 11
2.3.2 Catalase (CAT)..... 13
2.3.3 Glutationa redutase (GR) e ascorbato peroxidase (APX)..... 13
2.4 Estresse Oxidativo na Pós-Colheita..... 15
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 18
3.1 Material Vegetal..... 18
3.2 Avaliações..... 19
3.2.1 Cor da casca..... 19
3.2.2 Sólidos solúveis..... 20
3.2.3 Acidez titulável..... 20
3.2.4 Ácido ascórbico..... 20
3.2.5 Firmeza da polpa..... 21
3.2.6 Respiração e produção de etileno..... 21
3.2.7 Peroxidação lipídica..... 22
3.2.8 Extração de proteínas..... 22
3.2.9 Determinação de proteína total solúvel..... 23
3.2.10 Catalase (CAT)..... 23
3.2.11 Superóxido dismutase (SOD)..... 23
3.2.11.1 Determinação das isoformas de SOD..... 24
3.2.12 Glutationa redutase (GR)..... 25
3.2.13 Ascorbato peroxidase (APX)..... 25
3.3 Delineamento Experimental e Análise dos Resultados..... 26
4 RESULTADOS..... 26
4.1 Respiração e Produção de Etileno..... 26
4.2 Atividade da Catalase em Espectrofotômetro..... 28
4.3 Atividade da Glutationa Redutase em Espectrofotômetro e em PAGE..... 31
4.4 Atividade da Superóxido Dismutase em PAGE..... 32
4.5 Atividade da Ascorbato Peroxidase em Espectrofotômetro..... 34
4.6 Peroxidação Lipídica..... 36
4.7 Firmeza e Coloração dos Frutos..... 37
4.8 Análises Químicas..... 39
5 DISCUSSÃO..... 41
6 CONCLUSÕES..... 52
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICASS..... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sólidos solúveis, acidez titulável e teor de ácido ascórbico em mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%..... 41

Tabela 2 - Sólidos solúveis, acidez titulável e teor de ácido ascórbico em morangos 'IAC-Campinas' armazenados por 5 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%..... 41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção e eliminação das espécies ativas de oxigênio em organismos vegetais (DELITE, 2007). APX = Ascorbato peroxidase; CAT = Catalase; DHA = Dehidroascorbato; DHAR = Dehidroascorbato redutase; GPX = Glutationa peroxidase; GR = Glutationa redutase; GSH = Glutationa reduzida; GSSG = Glutationa oxidada; MDA = Monodehidroascorbato; MDAR = Monodehidroascorbato redutase; PSI = Fotossistema I; SOD = Superóxido dismutase..... 10

Figura 2 - Modelo proposto para o funcionamento do ciclo ascorbato-glutationa nos peroxissomos foliares (JIMÉNEZ et al., 1997). ASC = Ascorbato, forma reduzida; Cit b = Citocromo b; DHA = Dehidroascorbato; MDHA = Monodehidroascorbato; SOD = Superóxido dismutase; XOD = Xantina oxidase..... 15

Figura 3 - Mamões 'Golden' no estádio de amadurecimento 1..... 19

Figura 4 - Morangos 'IAC-Campinas' com 2/3 da superfície colorida..... 19

Figura 5 - Produção de etileno em mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3)..... 27

Figura 6 - Respiração em mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3)..... 28

Figura 7 - Produção de etileno em morangos 'IAC-Campinas' armazenados por 5 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3)..... 29

Figura 8 - Respiração em morangos 'IAC-Campinas' armazenados por 5 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3)..... 29

Figura 9 - Atividade da catalase (CAT) em mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3)..... 30

Figura 10 - Atividade da glutationa redutase (GR) em mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3)..... 31

Figura 11 - Atividade da glutationa redutase (GR) em PAGE em mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Padrão (P) GR bovino; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 representam os dias de armazenamento dos frutos. Algarismos romanos representam as isoformas de GR..... 32

Figura 12 - Atividade da glutationa redutase (GR) em PAGE em morangos 'IAC-Campinas' armazenados por 5 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Padrão (P) GR bovino; 1, 2, 3, 4 e 5 representam os dias de armazenamento dos frutos. Algarismos romanos representam as isoformas de GR..... 33

Figura 13 - Atividade da superóxido dismutase (SOD) em PAGE em mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Padrão (P) SOD bovino; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 representam os dias de armazenamento dos frutos. Algarismos romanos representam as isoformas de SOD..... 33

Figura 14 - Caracterização das isoformas da superóxido dismutase (SOD) em PAGE em mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Padrão (P) SOD bovino; 1 = Controle; 2 = Presença de KCN; 3 = Presença de H_2O_2..... 34

Figura 15 - Atividade da superóxido dismutase (SOD) em PAGE em morangos 'IAC-Campinas' armazenados por 5 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Padrão (P) SOD bovino; 1, 2, 3, 4 e 5 representam os dias de armazenamento dos frutos. Algarismos romanos representam as isoformas de SOD..... 35

Figura 16 - Atividade da ascorbato peroxidase (APX) na polpa de mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3)..... 35

Figura 17 - Quantidade de malondialdeído (MDA) em mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3)..... 37

Figura 18 - Firmeza da polpa de mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3)..... 38

Figura 19 - Firmeza da polpa de morangos 'IAC-Campinas' armazenados por 5 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3)..... 38

Figura 20 - Cor da casca de mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3)..... 39

Figura 21 - Cor da casca de mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Números indicam o período de armazenamento dos frutos, em dias..... 39

Figura 22 - Cor de morangos 'IAC-Campinas' armazenados por 5 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3)..... 40

Figura 23 - Cor de morangos ‘IAC-Campinas’ armazenados por 5 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Números indicam o período de armazenamento dos frutos, em dias..... 40

Enzimas antioxidantes em frutos com diferentes padrões de amadurecimento

RESUMO

O estudo teve como objetivo relacionar a atividade de enzimas antioxidantes e do estresse oxidativo com o padrão respiratório e produção de etileno durante a pós-colheita, utilizando para isso, mamão (fruto considerado climatérico) e morango (fruto considerado não climatérico). Foram utilizados mamões 'Golden', no estádio de amadurecimento 1 (15% da casca amarela) e morangos 'IAC-Campinas' com 2/3 da superfície colorida, armazenados a 22 ºC por 9 e 5 dias, respectivamente. Foram avaliadas, diariamente, respiração, produção de etileno, peroxidação lipídica, atividade de enzimas antioxidantes, firmeza da polpa e cor da casca; e em dias alternados, acidez titulável, teor de sólidos solúveis e de ácido ascórbico. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições de um fruto e os resultados comparados pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Foi observado aumento na produção de etileno no segundo dia de armazenamento, seguido por acréscimo na respiração dos mamões. Aumento na atividade da catalase, glutationa redutase e ascorbato peroxidase em mamões foi observado concomitantemente ou logo após o aumento na produção de etileno e respiração. O aumento da atividade dessas enzimas, próximo ao pico de etileno e de respiração, está relacionado à produção de oxidantes com o início do amadurecimento. No quarto dia de armazenamento dos mamões houve aumento da peroxidação lipídica e diminuição da atividade das enzimas catalase, glutationa redutase e superóxido dismutase. A peroxidação lipídica induz o aumento de enzimas antioxidantes, o que pode ser verificado por novos aumentos das atividades da catalase, glutationa redutase, superóxido dismutase e ascorbato peroxidase. Com relação às características físico-químicas, os sólidos solúveis não variaram significativamente, a acidez e o teor de ácido ascórbico aumentaram e o ângulo de cor e a firmeza decresceram durante o armazenamento dos mamões. Nos morangos, a magnitude das mudanças fisiológicas e das características físico-químicas foi bem menor quando comparamos ao mamão e o aumento da respiração desses frutos ocorreu somente no final do período pós-colheita. O amadurecimento pode, então, ser visto como um fenômeno oxidativo que envolve peroxidação lipídica pelos radicais livres e alterações nos níveis de antioxidantes. No início do amadurecimento de mamões, o etileno pode ser considerado o gatilho para as alterações no fruto e não uma resposta a um possível estresse oxidativo. O climatério respiratório parece ser consequência do aumento do metabolismo celular, mas, como ele próprio é fonte de espécies ativas de oxigênio, contribui para a ocorrência do estresse

oxidativo, evidenciado por alterações na catalase, glutationa redutase, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e peroxidação lipídica. Os morangos apresentaram alterações nas atividades da glutationa redutase e da superóxido dismutase, além de mostrarem mudanças nas características físico-químicas, na respiração e na produção de etileno. Contudo, os resultados foram inconclusivos para relacionar a atividade das enzimas antioxidantes com o padrão de amadurecimento do morango.

Palavras-chave: *Carica papaya*, *Fragaria x ananassa*, climatério, estresse oxidativo, etileno.

Antioxidant enzymes in fruits with different ripening patterns

ABSTRACT

The aim of this study was to correlate the activity of antioxidant enzymes and oxidative stress to respiration pattern and ethylene production during postharvest, using for this, papaya (considered a climacteric fruit) and strawberry (considered a nonclimacteric fruit). 'Golden' papayas at maturity stage 1 (15% of yellow skin) and 'IAC-Campinas' strawberries with 2/3 of colored surface, were stored at 22 °C for 9 and 5 days respectively. They were daily evaluated for respiration, ethylene production, lipid peroxidation, antioxidant enzymes, firmness and skin color, and on alternate days for acidity, soluble solids and ascorbic acid content. The experimental design was completely randomized with three replicates of one fruit and the data were analyzed using the Tukey test ($P \leq 0.05$) to compare means. An increase in ethylene production was observed in the second day of storage, followed by an increase in papaya respiration. An increased activity of catalase, glutathione reductase and ascorbate peroxidase in papaya was observed concurrently or soon after the increase in ethylene production and respiration. The increased activity of these enzymes near the peak of ethylene and respiration is related to the production of oxidants with the onset of ripening. On the fourth day of papaya storage there was an increased lipid peroxidation and a decreased activity of catalase, glutathione reductase and superoxide dismutase. Lipid peroxidation induces increase of antioxidant enzymes, which can be verified by further increases in the activities of catalase, glutathione reductase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase. Regarding physical-chemical characteristics, the soluble solids did not vary significantly, acidity and ascorbic acid content increased, and hue angle and firmness decreased during papaya storage. In strawberry, the magnitude of physiological changes and physical-chemical characteristics was much lower when compared to papaya and increased respiration of fruits occurred only at the end of the postharvest period. The ripening can then be considered as a phenomenon that involves lipid peroxidation by free radicals and altered levels of antioxidants. At the beginning of papaya ripening, ethylene is shown as a trigger for changes in fruit and not as a response to possible oxidative stress. The climacteric respiration is a consequence of increased cellular metabolism, but, as a source of reactive oxygen species, it contributes to the occurrence of oxidative stress, evidenced by changes in catalase, glutathione reductase, superoxide dismutase, ascorbato peroxidase and lipid peroxidation. The strawberries had changes in activities of glutathione reductase and superoxide dismutase, and

show changes in the physico-chemical characteristics, respiration and ethylene production. However, the results were inconclusive for relating the activity of antioxidant enzymes with the pattern of strawberries ripening.

Key Words: *Carica papaya*, *Fragaria x ananassa*, climacteric, ethylene, oxidative stress.

1 INTRODUÇÃO

O amadurecimento envolve uma série de mudanças fisiológicas e bioquímicas nos frutos que alteram sua composição e que, deste modo, permitem seu consumo. Portanto, o amadurecimento dos frutos é visto como a fase que permite que o fruto seja utilizado na alimentação humana. O processo seguinte ao amadurecimento é definido como senescência, ou seja, uma série de transformações que conduzem à morte dos tecidos (WATADA et al., 1984). Essa é uma visão antropocêntrica de todo o processo do amadurecimento que pode limitar a compreensão dos fenômenos que ocorrem após a colheita dos frutos.

Os aumentos da respiração e da produção de etileno sempre foram considerados processos-chave para o amadurecimento dos frutos, uma vez que se estabeleceu a necessidade de aumento da demanda energética e da presença de etileno para que o fruto amadurecesse. Com o progresso das pesquisas, verificou-se que alguns processos do amadurecimento não estão relacionados com o aumento da respiração (ROMANI et al., 1983) e que, alguns, também são independentes do aumento na produção de etileno, ou apresentam dependência parcial (FLORES et al., 2001), contrariando os antigos conceitos. Em estudos com melões, coloração da polpa, acúmulo de açúcares e perda de acidez são processos independentes do etileno, enquanto que o amarelecimento da casca, o amolecimento da polpa, o desenvolvimento da zona de abscisão peduncular, a formação de aroma e o climatério respiratório são totalmente ou parcialmente dependentes do etileno (PECH et al., 2008).

Questiona-se então qual seria o papel do climatério respiratório encontrado em alguns frutos e também qual a função de um aumento brusco na produção do etileno. Algumas explicações para a ocorrência do climatério foram propostas, tais como: um resultado da mudança na organização celular resultante do início da senescência; ou uma resposta homeostática da mitocôndria para compensar os efeitos degradantes da senescência celular (ROMANI, 1984). Portanto, o aumento na respiração e também na produção de etileno pode ser considerado resposta a algum tipo de estresse.

Assim, o amadurecimento pode ser visto como um fenômeno oxidativo que envolve peroxidação lipídica pelos radicais livres, desestruturação da membrana fosfolipídica e diminuição do nível de enzimas antioxidantes. Então, o amadurecimento poderia ser considerado como um processo da senescência? O aumento da respiração e da produção de etileno pode ser considerado como resposta celular ao estresse oxidativo? Talvez a mudança

do enfoque de como vemos e estudamos o complexo fenômeno do amadurecimento nos auxilie a entender como os processos dessa fase acontecem, são regulados e influenciados. Desta forma, novas possibilidades podem surgir para manipulá-los contribuindo para a obtenção de frutos com maior durabilidade pós-colheita.

Grande parte da literatura sobre estudos da fisiologia do amadurecimento considera essa fase como um período anterior à senescência, relacionando as alterações nos atributos sensoriais dos frutos, principalmente, às mudanças na atividade respiratória e na produção de etileno. O estresse oxidativo durante o amadurecimento e senescência tem sido pesquisado em frutos como tomate, maçã, amora e também em flores, mas poucos estudos com esse enfoque foram realizados com frutos de espécies tropicais.

Uma vez que o climatério é fonte de espécies ativas de oxigênio (EAOs), frutos classificados como climatéricos podem produzir mais EAOs e, portanto, apresentar maior estresse oxidativo na pós-colheita quando comparados a frutos não climatéricos. As respostas fisiológicas encontradas em alguns frutos, como aumento na respiração e produção de etileno, podem ter estreita relação com o estresse oxidativo que acontece nessa fase.

Desta forma, o objetivo dessa pesquisa foi relacionar a atividade de enzimas antioxidantes e do estresse oxidativo com o padrão respiratório e produção de etileno durante a pós-colheita, utilizando para isso mamão, considerado pela classificação tradicional como fruto climatérico, e morango, considerado um fruto não-climatérico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Amadurecimento e Senescência

O amadurecimento é definido como um processo do desenvolvimento dos frutos que abrange desde os estádios finais do crescimento até os estádios iniciais da senescência e que resulta em características estéticas e de qualidade, evidenciadas por mudanças na composição, coloração, textura e demais atributos sensoriais (WATADA et al., 1984). O processo de amadurecimento é um fenômeno complexo do desenvolvimento dos frutos que consiste, principalmente, em alterações bioquímicas dos componentes já existentes no órgão (AZEVEDO et al., 2008). O processo do amadurecimento é influenciado por diversos fatores como expressão de genes, hormônios, luz, temperatura, entre outros (ADAMS-PHILLIPS et al., 2004). O amadurecimento dos frutos, portanto, é um processo geneticamente programado,

altamente coordenado e irreversível, envolvendo uma série de mudanças fisiológicas, bioquímicas e organolépticas que levam à obtenção de frutos comestíveis e com qualidades desejáveis (THARANATHAN et al., 2006).

Vários são os processos de síntese e degradação que ocorrem no amadurecimento como aumento da respiração; degradação da clorofila; biossíntese de carotenóides, antocianinas, óleos essenciais e componentes do sabor; aumento da atividade das enzimas degradantes da parede celular e da produção de etileno (SALTVEIT, 1999).

As mudanças do amadurecimento envolvem múltiplos caminhos bioquímicos que afetam todos os compartimentos celulares (THARANATHAN et al., 2006). O amadurecimento é acompanhado por mudança na coloração, que é causada pela degradação da clorofila, síntese de diferentes tipos de antocianinas e seu acúmulo nos vacúolos (MEDLICOTT et al., 1987), e acúmulo de carotenóides como β-caroteno, xantofilas e licopeno nos plastídeos (LIZADA, 1993). O aumento na doçura, como um resultado da hidrólise de polissacarídeos (especialmente amido) e do balanço açúcares/ácidos orgânicos, é responsável pelo desenvolvimento do sabor (THARANATHAN et al., 2006).

O fenômeno do amadurecimento também está associado às mudanças na espessura da parede celular, na integridade estrutural e aumento nos espaços intracelulares, levando à perda de firmeza (THARANATHAN et al., 2006). As maiores mudanças na firmeza durante o amadurecimento dos frutos são devido à alteração, mediada por enzimas, na estrutura e composição da parede celular, o que promove a parcial ou completa solubilização dos polissacarídeos (pectinas e celuloses) (FUCHS et al., 1980).

Quando diferentes espécies vegetais são comparadas, o amadurecimento dos frutos parece ser um processo altamente variável (KUNTZ et al., 1998). Apesar de numerosas diferenças, frutos têm sido classificados em duas categorias: climatéricos e não climatéricos, que diferem em seus padrões de respiração e síntese de etileno no estádio inicial do amadurecimento (BIALE & YOUNG, 1982).

KIDD & WEST (1925) apud RHODES (1980), estudando a fisiologia do amadurecimento em maçã, verificaram que o amadurecimento desse fruto era marcado por uma elevação na respiração e denominaram esse fenômeno de respiração climatérica. De acordo com BIALE et al. (1954), a produção de etileno aumenta drasticamente durante o amadurecimento de frutos que apresentam respiração climatérica, podendo esse pico coincidir, ocorrer antes ou depois da máxima atividade respiratória. Portanto, o período climatérico é o período no desenvolvimento de alguns frutos que envolve uma série de

mudanças bioquímicas associadas com o aumento da respiração e com a produção autocatalítica de etileno (WATADA et al., 1984).

Frutos climatéricos, como abacate, banana, tomate e mamão, apresentam aumento na respiração no final do desenvolvimento. Esse climatério respiratório pode ser resultado de um aumento na síntese de etileno que, inicia-se antes da mudança respiratória, é inseparável desta (BIALE & YOUNG, 1982), ou pode ocorrer depois da mesma (NELSON, 1940). Esse comportamento gera controvérsias quanto ao fato de ser ou não o etileno o iniciador do climatério, ou seja, se a sua produção endógena é ou não o sinal para desencadear as mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem no climatério (CHITARRA & CHITARRA, 1990). Já frutos não climatéricos, como laranja, pepino, pimenta e morango, não mostram mudanças significativas na respiração (ou um declínio contínuo) após a colheita e, portanto, não exibem amadurecimento intenso (SALTVEIT, 1993).

Classicamente, o climatério pode ser definido como um período da ontogenia de certos frutos, tendo três componentes distintos: (1) aumento autocatalítico na produção de etileno; (2) aumento da respiração, que é referente ao 'climatério respiratório'; e (3) que o aumento autocatalítico de etileno e da respiração é acompanhado por mudanças fenotípicas e genéticas nos frutos que os levam a serem identificados como maduros (RHODES, 1970). Segundo CHITARRA & CHITARRA (1990), o aumento na respiração é um evento secundário e depende dos níveis disponíveis de etileno.

O termo climatério inicialmente envolveu somente o conceito do aumento da respiração dos frutos, mas a produção de etileno, juntamente com a produção de CO_2, é agora aceita como um critério para identificar os frutos climatéricos (ABELES et al., 1992). Assim, para CHITARRA & CHITARRA (1990), esse termo deve ser aplicado ao total de mudanças que ocorrem nessa fase crítica da vida do fruto, que são desencadeadas pelo etileno e durante as quais muitas alterações ocorrem, sendo uma delas o aumento na respiração.

O etileno é um hormônio vegetal, que existe no estado gasoso e regula muitos aspectos do crescimento da planta, desenvolvimento e metabolismo celular incluindo início do amadurecimento e senescência, particularmente nos frutos climatéricos. É biologicamente ativo em quantidades traços. O amadurecimento dos frutos climatéricos é controlado pelo etileno, que é autocataliticamente sintetizado em pequenas concentrações antes do início do amadurecimento (THARANATHAN et al., 2006).

O caminho de biossíntese do etileno foi primeiro estabelecido em maçãs. Duas enzimas chaves nesse caminho são aquelas que catalisam a conversão do S-adenosil metionina (SAM) em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) e do ACC em etileno,

denominadas ACC sintase e ACC oxidase, respectivamente. No início do amadurecimento dos frutos, a expressão de múltiplos genes da ACC sintase é ativada, resultando na produção aumentada de ACC. Depois, o ACC é oxidado a etileno pela ACC oxidase. Em muitos casos, é a atividade da ACC sintase que determina a velocidade de biossíntese do etileno (ADAMS & YANG, 1979).

Além da sua influência sobre a respiração, o etileno desempenha papel principal no amadurecimento dos frutos (THEOLOGIS, 1992) e seus efeitos são, pelo menos em parte, mediados pela expressão de genes (KUNTZ et al., 1998). Os termos 'sistema I' e 'sistema II' foram introduzidos por McMURCHIE et al. (1972) para descrever os diferentes padrões de biossíntese de etileno que ocorrem nos frutos não climatéricos e climatéricos, respectivamente. A produção basal de etileno do sistema I é baixa e é inibida pelo etileno exógeno (auto-inibição). O sistema I ocorre nos frutos não climatéricos, climatéricos e em tecidos vegetativos. O sistema II representa a explosão autocatalítica de produção de etileno acompanhada do processo de amadurecimento dos frutos climatéricos. Essas concepções têm adquirido novos significados com o esclarecimento da regulação bioquímica e molecular da biossíntese de etileno (OETIKER & YANG, 1995). É atualmente aceito que, nos frutos climatéricos, o início do amadurecimento envolve uma transição do sistema I para o sistema II de biossíntese do etileno (BARRY et al., 2000; HACKETT et al., 2000).

O papel do etileno no processo de amadurecimento dos frutos climatéricos tem sido estudado (BRADY & SPEIRS, 1991; OETIKER & YANG, 1995). O aumento na produção de etileno no início do amadurecimento é considerado o controlador do início das mudanças na coloração, aroma, textura, sabor e outros atributos bioquímicos e fisiológicos (KATZ et al., 2004). Portanto, a produção do etileno tem sido considerada como o principal marcador fisiológico do período climatérico (RHODES et al., 1970; SALTVEIT, 1999).

Em contraste às muitas informações sobre a regulação do amadurecimento nos frutos climatéricos, muito menos é conhecido sobre os não climatéricos. Além disso, os resultados disponíveis parecem excluir a existência de um único modelo regulador para todos esses frutos. Até o presente momento, nenhum regulador do crescimento parece desempenhar sozinho um papel positivo análogo ao papel desempenhado pelo etileno no amadurecimento dos frutos climatéricos. Uma vez que os frutos não climatéricos também são capazes de sintetizar etileno e, em alguns casos, tem sido mostrado que o etileno pode acelerar a deterioração pós-colheita, o possível envolvimento desse hormônio no amadurecimento de frutos não climatéricos ainda tem sido estudado. Entretanto, apesar de muitos esforços, nenhum resultado tem demonstrado claramente uma relação entre o etileno e o

amadurecimento desses frutos (TRAINOTTI et al., 2005). Uma situação mais específica parece estar presente em morangos no que diz respeito à relação entre etileno e amadurecimento de frutos. TIAN et al. (2000), a fim de explicar a variabilidade de resultados obtidos pelo tratamento de morangos com etileno e/ou 1-metilciclopropeno, propuseram a hipótese que morangos podem ter receptores de etileno diferentes daqueles presentes nos frutos climatéricos, e/ou que os receptores de etileno podem realizar diferentes funções nos frutos não climatéricos. Segundo esses autores, o etileno exógeno estimulou a respiração pela regulação da síntese de enzimas nos morangos, entretanto, não foi necessário que o etileno se ligasse ao seu receptor para estimular a respiração nesses frutos. No entanto, os estudos realizados ainda não mostram resultados conclusivos sobre o papel do etileno nesses frutos (BOWER et al., 2003; TIAN et al., 2000).

Diferente do amadurecimento, a senescência é considerada um processo de deterioração que leva à morte celular no estádio final do desenvolvimento (NOODÉN, 1988; WATADA et al., 1984). Esse fenômeno consiste de inúmeros processos, incluindo deterioração da estrutura celular e degradação de macromoléculas (CHEN et al., 2008), alterações similares com as que ocorrem durante o processo de amadurecimento. Durante o processo de senescência, a degradação de macromoléculas como proteínas, ácidos nucléicos, e lipídios, que contribui para a reciclagem de nutrientes das regiões com crescimento ativo, é controlada por muitos enzimas (BUCHANAN-WOLLASTON, 1997; PAGE et al., 2001; UEDA et al., 2000). Diante de todas as evidências apresentadas, ainda existe uma incerteza sobre uma distinção bem delineada entre amadurecimento e senescência, embora cada um dos processos que contribui para a senescência, conduza diretamente à morte dos tecidos. O processo da senescência aumenta a probabilidade de morte, como, por exemplo, por desidratação ou invasão de microorganismos; porém, não há evidências de que inclua a morte programada das células (CHITARRA & CHITARRA, 1990).

2.2 Estresse Oxidativo

Em sua configuração normal o O_2 é pouco reativo nas células. No entanto, durante os processos metabólicos normais, e como conseqüência de diversos estresses, o O_2 é reduzido por univalência, através de reações sequenciais que podem ocasionar a formação das espécies ativas de oxigênio (EAOs) (CABISCOL et al., 2000), as quais incluem o radical ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) (SCANDALIOS, 2005).

A geração de EAOs faz parte do metabolismo aeróbio normal, mas em diversas situações, a produção dessas espécies é aumentada, seja por fonte endógena ou exógena. Dentre as fontes endógenas pode-se citar: metabolismo aeróbio normal, cadeia respiratória, reações de Fenton e Haber-Weiss, dentre outras (GEORGIEVA, 2005; SCANDALIOS, 2005). Já as fontes exógenas envolvem vários fatores ambientais de estresse como: seca, metais pesados, elevadas concentrações de sais, extremos de temperatura, radiação ultravioleta, poluição do ar, herbicidas, estresse físico e mecânico e também estresses bióticos como o ataque de patógenos (MALLICK & MOHN, 2000).

O estresse oxidativo é causado pelo desequilíbrio entre a produção de EAOs e a sua remoção pelo sistema antioxidante. O aumento da produção desses agentes oxidantes é considerado uma característica do estresse oxidativo (ARORA et al., 2002). As EAOs inativam enzimas e causam importantes danos nos componentes celulares como a peroxidação lipídica dos ácidos graxos resultando na formação de alguns produtos como o malondialdeído (HODGES et al., 1999). O estresse oxidativo é um processo essencialmente regulatório, o equilíbrio entre as capacidades oxidativa e antioxidativa determina o destino da célula. Sob condições não estressantes, o sistema de defesa antioxidante fornece proteção adequada contra o oxigênio ativo e os radicais livres (ASADA & TAKAHASHI, 1987).

2.2.1 Ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$)

A respiração é a primeira fonte de ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$) (PURVIS et al., 1995). O $O_2^{-\bullet}$, devido sua meia vida curta, é considerado não reativo em comparação com outros radicais livres. O perigo principal da produção do $O_2^{-\bullet}$ é a capacidade de reação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a formação de radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) (LANCAN & BACCOU, 1998).

As mitocôndrias são importantes fontes de $O_2^{-\bullet}$ e, como a presença deste ânion-radical pode causar sérios danos, elas são ricas em superóxido dismutase (SOD) que o converte em H_2O_2 (BARREIROS & DAVID, 2006).

A ferredoxina e os carregadores de elétrons atuantes no lado redutor do fotossistema I da fotossíntese têm potenciais eletroquímicos suficientemente negativos para doar elétrons para o oxigênio (ASADA & TAKAHASHI, 1987), resultando na formação do radical $O_2^{-\bullet}$ (ARORA et al., 2002). A maioria da redução do O_2 é via ferredoxina reduzida, que reduz o oxigênio molecular em $O_2^{-\bullet}$. O H_2O_2 é então formado através da dismutação do $O_2^{-\bullet}$. Este

último ocorre espontaneamente, mas a velocidade da reação é fortemente aumentada pela SOD (ARORA et al., 2002).

O H_2O_2 e o $O_2^{-\bullet}$ por si próprios são relativamente pouco danosos, mas eles podem formar espécies danosas aos componentes celulares essenciais como $OH^{\bullet}$, que podem iniciar a peroxidação lipídica e também danificar DNA, proteínas e muitas moléculas pequenas (ARORA et al., 2002).

2.2.2 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) exerce um papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares facilmente e gerar o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$). O H_2O_2 é gerado *in vivo* pela dismutação do radical ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$) por enzimas oxidases ou pela β-oxidação de ácidos graxos (BARREIROS & DAVID, 2006).

O H_2O_2 é um oxidante forte que pode desencadear dano oxidativo localizado, conduzindo à perda das funções metabólicas e da integridade celular nos sítios onde ele se acumula (FOYER et al., 1997). O H_2O_2 também pode causar quebra de DNA e atuar na inativação de enzimas que contêm tiol, como as moduladas pela tioredoxina do estroma do cloroplasto (CHARLES & HALLIWELL, 1981). Além disso, o H_2O_2 pode atuar como um mensageiro secundário na indução seletiva de genes de defesa (FOYER et al., 1997).

As principais enzimas eliminadoras de H_2O_2 nas plantas são a catalase (CAT), que está localizada nos peroxissomos/glioxissomos, e ascorbato peroxidase (APX), que é primeiramente encontrada no citosol e nos cloroplastos (ASADA, 1992; WILLEKENS et al., 1995). A distribuição subcelular dessas enzimas sugere que a APX cloroplástica remove o H_2O_2 produzido durante a reação de Mehler e outros processos cloroplásticos, usando um fotoredutante produzido no tilacóide como um doador de elétrons (ASADA & BADGER, 1984; NAKANO & ASADA, 1981), enquanto a CAT elimina o H_2O_2 fotorrespiratório. Entretanto, a situação provavelmente é muito mais complexa, primeiramente pelo fato do H_2O_2 não ser estritamente compartimentalizado, sendo capaz de se difundir livremente através das membranas e, em segundo, pelo fato da CAT e da APX terem propriedades catalíticas distintas. A CAT não consome poder redutor e tem uma taxa de reação muito alta, mas pobre afinidade por H_2O_2. APX requer uma fonte redutante, ascorbato, e tem uma maior afinidade para H_2O_2 do que a CAT (WILLEKENS et al., 1997). A difusão do H_2O_2 dos cloroplastos

para os peroxissomos e sua eliminação pela CAT são muito raras de acontecer (FOYER & HALLIWELL, 1976).

2.2.3 Radical hidroxila ($OH^{\bullet}$)

O radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) é considerado o mais reativo oxidante na célula, pois, devido a sua meia vida muito curta, dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Este radical frequentemente causa danos às moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações (BARREIROS & DAVID, 2006).

O $OH^{\bullet}$ pode causar danos em todas as classes de macromoléculas biologicamente importantes, especialmente ácidos nucléicos (DNA e RNA) (BARREIROS & DAVID, 2006). Também pode modificar as proteínas assim como torná-las mais suscetíveis ao ataque proteolítico (CASANO et al., 1994), além de causar danos aos lipídios e às membranas celulares do núcleo e mitocôndria (BARREIROS & DAVID, 2006). O exemplo mais comum de danos do $OH^{\bullet}$ a lipídios é a ação deste nos lipídios de membrana. Os radicais livres centrados no oxigênio ($OH^{\bullet}$) atingem a cadeia lipídica em sítios susceptíveis como o grupo metilênico alílico, convertendo-o em novo centro de radical livre (BARREIROS & DAVID, 2006). O carbono radicalar facilmente adiciona oxigênio gerando o radical lipídio-peroxila, que pode facilmente atacar as proteínas de membrana, produzindo danos nas células. Os ácidos graxos poli-insaturados são mais susceptíveis ao ataque por radicais livres, devido ao carbono metilênico *bis*-alílico (BARREIROS & DAVID, 2006).

Existem duas maneiras de controlar a presença do $OH^{\bullet}$: reparar os danos causados por ele ou inibir sua formação (BARREIROS & DAVID, 2006).

2.3 Sistema Antioxidante

Para minimizar os efeitos danosos resultantes da ação das espécies ativas de oxigênio (EAOs), os organismos vegetais desenvolveram mecanismos capazes de combater, neutralizar ou eliminar a produção de EAOs, denominado de sistema antioxidante de defesa (ARORA et al., 2002), o qual pode ser dividido em não-enzimático e enzimático. As defesas não-enzimáticas incluem compostos com propriedade antioxidante intrínseca, como o β-caroteno, α-tocoferol (vitamina E), glutationa reduzida (GSH), ácido ascórbico (SCANDALIOS, 2005), NADPH e NADH, as quais são moléculas que ajudam a manter o ambiente redutor

(CABISCOL et al., 2000). Já os mecanismos enzimáticos envolvem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa redutase (GR), glutationa S-transferase (GST), ascorbato peroxidase (APX), dentre outras (FOYER et al., 1994; SCANDALIOS, 2005).

Estudos sugerem que o apoplasto, cloroplasto, citoplasma, mitocôndria e peroxissomo contêm mecanismos eliminadores de EAOs (FOYER & NOCTOR, 2003; NOCTOR et al., 2004; PIGNOCCHI & FOYER, 2003). Os caminhos eliminadores de EAOs das plantas podem envolver os seguintes ciclos: ciclo água-água nos cloroplastos que inclui a SOD; ciclo ascorbato-glutationa nos cloroplastos, citosol, mitocôndria, apoplasto e peroxissomos; GR e CAT nos peroxissomos (Figura 1) (DELITE, 2007).

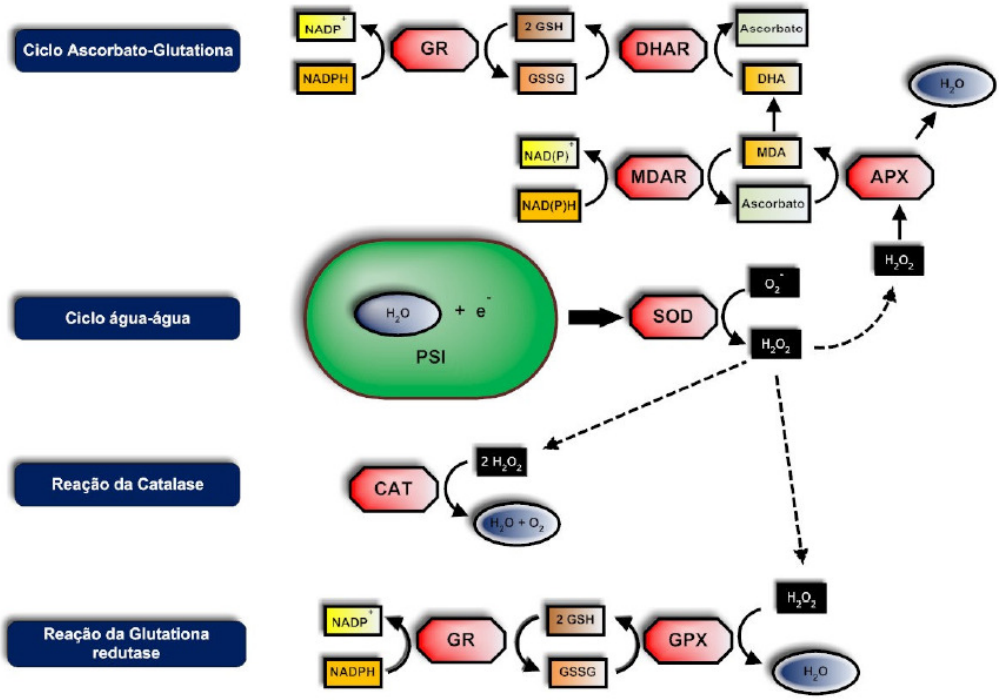


Figura 1 – Produção e eliminação das espécies ativas de oxigênio em organismos vegetais (DELITE, 2007). APX = Ascorbato peroxidase; CAT = Catalase; DHA = Dehidroascorbato; DHAR = Dehidroascorbato redutase; GPX = Glutationa peroxidase; GR = Glutationa redutase; GSH = Glutationa reduzida; GSSG = Glutationa oxidada; MDA = Monodehidroascorbato; MDAR = Monodehidroascorbato redutase; PSI = Fotossistema I; SOD = Superóxido dismutase.

A fotoredução do dioxigênio à água no fotossistema I (PSI) pelos elétrons gerados no fotossistema II (PSII) é referida como ciclo água-água nos cloroplastos (GRATÃO et al.,

2005). A função mais importante desse ciclo é a eliminação do ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) dos seus sítios geradores, diminuindo seus tempos de vida para suprimir a produção de radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e sua interação com as moléculas presentes nos cloroplastos (ASADA, 2000). O ciclo ascorbato-glutationa no cloroplasto, também referido como ciclo Foyer-Halliwell-Asada, envolve sucessivas oxidações e reduções do ascorbato, glutationa e NADPH pelas enzimas dehidroascorbato redutase (DHAR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), APX e GR (GRATÃO et al., 2005).

Durante os estresses bióticos e abióticos, a mitocôndria pode ser danificada pelo estresse oxidativo, por ser muito susceptível à inibição oxidativa de suas funções (MILLAR et al., 2003; MOLLER, 2001; TAYLOR et al., 2003). A remoção do H_2O_2 produzido no cloroplasto é essencial para evitar a inibição das enzimas do ciclo de Calvin (WILLEKENS et al., 1997). O estresse oxidativo também pode causar a proliferação dos peroxissomos, que têm um sistema eficiente para a eliminação das EAOs, especialmente H_2O_2 (IGAMBERDIEV & LEA, 2002). Como os cloroplastos e mitocôndria, os peroxissomos vegetais também produzem $O_2^{-\bullet}$ e têm dois sítios de geração desse ânion, um na matriz da organela e outro sítio nas membranas peroxissomais dependente do NAD(P)H (DEL RÍO et al., 2002).

Existe um equilíbrio entre as EAOs e o sistema antioxidante. O estado de equilíbrio entre a geração de EAOs e a capacidade de proteção endógena do sistema antioxidante pode ser especificado como Balanço Oxidativo Ecológico (BOE). Nesse estado, há máxima proteção contra as influências tóxicas oxidativas. Quando esse equilíbrio é perturbado, os sistemas biológicos estão expostos à ação das EAOs, resultando no estado de estresse oxidativo (GEORGIEVA, 2005; MATÉS, 2000), o qual desencadeia os danos descritos anteriormente.

2.3.1 Superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) é a primeira enzima de defesa contra danos provocados por espécies ativas de oxigênio (EAOs) nas células (ALSCHER et al., 1997; SCANDALIOS, 2005). A SOD catalisa a reação de dismutação do ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), com a remoção do $O_2^{-\bullet}$.

$$O_2^{-\bullet} + O_2^{-\bullet} + 2H^+ \xrightarrow[SOD]{} O_2 + H_2O_2$$

A SOD foi isolada em eritrócitos bovinos em 1938, mas a função desta foi descrita por McCORD & FRIDOVICH (1969). Presente em organismos vegetais, esta enzima caracteriza um grupo de metaloenzimas que catalisam a formação de H_2O_2 a partir de $O_2^{-\bullet}$, consumindo-o, e assim, livrando as células do risco de oxidação por esses radicais.

As SODs são as únicas enzimas cujas atividades interferem nas concentrações de $O_2^{-\bullet}$ e H_2O_2, os dois substratos da reação de Haber-Weiss que origina o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e provavelmente por isso, as SODs representam o mecanismo de defesa central dos organismos vivos (ALSCHER et al., 1998). Estas metaloenzimas multiméricas têm sido classificadas em quatro grupos de acordo com o metal de seu sítio ativo: cobre/zinco (Cu/Zn), manganês (Mn), ferro (Fe) e níquel (Ni).

As enzimas Cu/Zn-SODs são geralmente encontradas no cloroplasto, no citosol e no peroxissomo das células vegetais (BUENO et al., 1995; OGAWA et al., 1995). Em procariotos, foram localizadas no periplasma ou ancoradas à membrana (BATTISTONI, 2003). A Cu/Zn-SOD ativa é um dímero e contém uma subunidade de cobre (Cu) e uma de zinco (Zn). A atividade da Cu/Zn-SOD é inibida pelo cianeto e inativada pelo H_2O_2. Em plantas, Cu/Zn-SOD é a mais abundante das três metaloproteínas. A Cu/Zn-SOD citosólica pode contribuir diretamente para a defesa antioxidante associada com a proteção do cloroplasto (ALSCHER et al., 1997).

As Mn-SODs são encontradas em procariotos e na matriz mitocondrial de todas as espécies vegetais (BAUM & SCANDALIOS, 1981; BOWLER et al., 1994) e são induzidas pelo etileno das plantas (BOWLER et al., 1992). Ambas Mn-SOD e Fe-SOD têm um átomo de metal por subunidade (ALSCHER et al., 1997).

Fe-SODs são geralmente encontradas em procariotos, em algas e em cloroplastos de algumas plantas superiores (ALSCHER et al., 1997; SCANDALIOS, 2005). Ni-SODs são geralmente encontradas em uma fração citosólica da bactéria do gênero *Streptomyces* (KEITH & VALVANO, 2007; OKAMOTO et al., 2001).

A eliminação das EAOs nos cloroplastos pela SOD envolve o tilacóide e o estroma (ALLEN, 1995). Na eliminação associada com o tilacóide, o $O_2^{-\bullet}$ é dismutado pela SOD (tanto pela forma Fe como pela Cu/Zn) e o H_2O_2 resultante é eliminado pela ascorbato peroxidase (APX) no limite do tilacóide. Na eliminação associada com o estroma, as EAOs que escapam do caminho do tilacóide são dismutadas pela Fe-SOD e pela APX do estroma (ALSCHER et al., 1997).

2.3.2 Catalase (CAT)

A catalase (CAT; EC 1.11.1.6), encontrada nos peroxissomos e glioxissomos das plantas, atua na decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Devido à sua ampla distribuição e capacidade de degradar rapidamente o H_2O_2, foi proposto que a CAT desempenha um papel fundamental nos sistemas antioxidantes (MALLICK & MOHN, 2000).

A CAT é a única entre as enzimas degradantes de H_2O_2 que não consome equivalentes redutores celulares e possui um mecanismo muito eficiente para remover o H_2O_2 formado nas células sob condições de estresse (SCANDALIOS, 2005). É tão eficiente que não pode ser saturada por H_2O_2 em nenhuma concentração (LLEDIAS et al., 1998).

A CAT é uma enzima tetramérica que contém grupos heme e é encontrada em todos os organismos vivos. Dependendo da concentração de H_2O_2, a CAT pode atuar com ações peroxidativas e catalíticas. O Fe do grupo heme interage com o H_2O_2, formando peróxido de ferro, rico em O_2, denominado de componente I. Em baixas concentrações de H_2O_2 (< 1 μM), a CAT atua com ações peroxidativas e o componente I pode ser reduzido por doadores de hidrogênio, como o etanol e ácido ascórbico. Em elevadas concentrações, atua rapidamente de forma catalítica, formando H_2O e O_2 (SCANDALIOS, 2005). Essas reações podem ser observadas abaixo:

$$RH_2 + H_2O_2 \xrightarrow{\textbf{CAT}} R + 2H_2O \text{ (ação peroxidativa)}$$

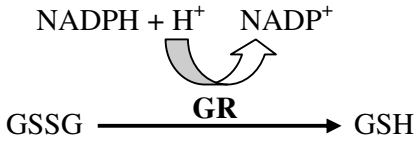
$$2H_2O_2 \xrightarrow[\textbf{CAT}]{} H_2O + O_2 \text{ (ação catalítica)}$$

2.3.3 Glutationa redutase (GR) e ascorbato peroxidase (APX)

A glutationa reduzida (GSH) em conjunto com duas enzimas, a Se-glutationa peroxidase (GPX) e glutationa redutase (GR), catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio, sendo que a glutationa opera em ciclos entre sua forma oxidada e reduzida (BABIOR, 1997). Os níveis das atividades da glutationa e das enzimas associadas desempenham um papel chave na contenção do estresse oxidativo (ROGIERS et al., 1998).

A GSH é um importante metabólito no combate às espécies ativas de oxigênio (EAOs) (especificamente H_2O_2). Para a regeneração da GSH, a partir da sua forma oxidada, a enzima chave é a glutationa redutase (GR) (GRATÃO et al., 2005). Essa enzima contém um grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD), transferidor de elétrons que catalisa a redução

dependente de NADPH da glutationa oxidada (GSSG) para GSH (CABISCOL et al., 2000), conforme a seguinte reação:



A GR (EC 1.6.4.2) é de ocorrência quase universal, sendo amplamente distribuída entre procariotos e eucariotos, desde bactérias heterotróficas e fotossintetizantes até plantas e animais superiores (NOCTOR et al., 2002). A glutationa atua para proteger os grupos tiol das enzimas, regenerando o ascorbato e reagindo com o oxigênio singleto e radicais hidroxila (ARORA et al., 2002).

A enzima ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) é uma enzima que catalisa a oxidação de substratos concomitantemente à redução do H_2O_2. Em células vegetais, o substrato redutor mais importante para a destoxificação de H_2O_2 é o ascorbato (MEHLHORN et al., 1996; NOCTOR & FOYER, 1998). A APX catalisa a reação em que duas moléculas de ascorbato são oxidadas para reduzir uma molécula de H_2O_2 a água e está envolvida na detoxificação do H_2O_2 tanto dentro da célula quanto no apoplasto (MEHLHORN, 1990; ZHENG & VAN HUYSTEE, 1992).

O ascorbato está presente nos cloroplastos, citosol, vacúolo e espaço apoplástico das células (FOYER, 1993), sendo que no apoplasto, é conhecido por regular as enzimas associadas à parede celular (MEHLHORN et al., 1996). O ascorbato é talvez o antioxidante mais importante nas plantas, com um papel fundamental na remoção do H_2O_2 (FOYER, 1993). A regeneração do ascorbato envolve a oxidação de GSH, o que por sua vez é regenerado por ação da GR (FOYER & HALLIWELL, 1976), constituindo o ciclo ascorbato-glutationa (NOCTOR & FOYER, 1998).

O ciclo ascorbato-glutationa, também denominado ciclo Foyer-Halliwell-Asada, é um caminho eficiente para as células vegetais eliminarem o H_2O_2 em certos compartimentos celulares onde esse metabólito é produzido e nenhuma catalase está presente (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2001). Esse ciclo usa os antioxidantes não enzimáticos ascorbato e glutationa em uma série de reações catalisadas por quatro enzimas antioxidantes: APX, monodehidroascorbato redutase (MDHAR), dehidroascorbato redutase (DHAR), e GR (JIMÉNEZ et al., 1997). Com base nas pesquisas realizadas, um modelo para o funcionamento desse ciclo nos peroxissomos foliares foi proposto (Figura 2).

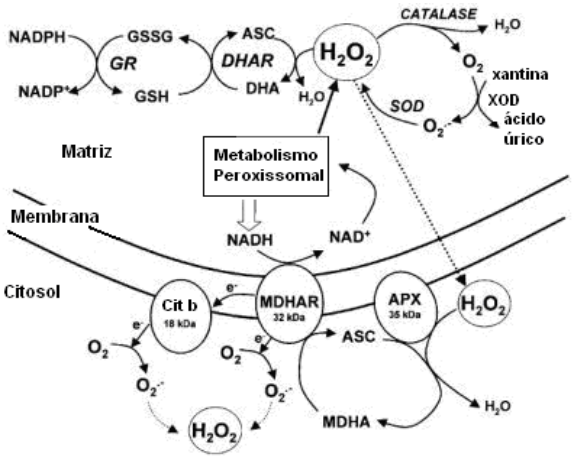


Figura 2 – Modelo proposto para o funcionamento do ciclo ascorbato-glutationa nos peroxissomos foliares (JIMÉNEZ et al., 1997). ASC = Ascorbato, forma reduzida; Cit b = Citocromo b; DHA = Dehidroascorbato; MDHA = Monodehidroascorbato; SOD = Superóxido dismutase; XOD = Xantina oxidase.

2.4 Estresse Oxidativo na Pós-Colheita

Apesar da presença de um eficiente sistema antioxidante, danos oxidativos continuam ocorrendo nas células das plantas devido a uma incontrolável ou ineficiente destruição das espécies ativas de oxigênio (EAOs). Durante os estádios iniciais de amadurecimento do fruto, o sistema antioxidante protege os frutos dos efeitos destrutivos do progressivo estresse oxidativo. Em estádios mais avançados, entretanto, os danos oxidativos ocorrem devido à diminuição das atividades das enzimas que eliminam as EAOs (MONDAL et al., 2004). Os radicais livres, uma vez não combatidos, induzem a uma série de danos celulares, entre eles a peroxidação lipídica (DHINDSA et al., 1982), que inicia as mudanças destrutivas associadas ao amadurecimento (DU & BRAMLAGE, 1994; MEIR et al., 1991). Os lipídios da membrana e os ácidos graxos livres são altamente susceptíveis à oxidação e o aumento do estresse oxidativo é, então, indicado pelo acúmulo de produtos da peroxidação lipídica. Portanto, o acúmulo de produtos da peroxidação lipídica é uma prova do aumento do estresse oxidativo durante a fase de amadurecimento do desenvolvimento dos frutos. Assim, o amadurecimento dos frutos é acompanhado por um aumento progressivo do estresse oxidativo/peroxidativo que afeta significativamente a saturação de lipídios polares (ROGIERS et al., 1998).

Além disso, o processo de amadurecimento dos frutos está associado a alterações de propriedades físicas da membrana e mudanças nas atividades das enzimas da membrana (LURIE & BEN-ARIE, 1983; THOMPSON et al., 1982). Aumento de extravasamento de íons, diminuição da fluidez da membrana plasmática, perda da integridade da membrana e acúmulo de peróxido lipídico foram observados em frutos como melão (LESTER & STEIN, 1993), maçã (LURIE & BEN-ARIE, 1983) e tomate (PALMA et al., 1995). Essas alterações são resultados do estresse oxidativo.

ROGIERS et al. (1998) mostraram que o estresse oxidativo aumentou progressivamente durante o amadurecimento, provavelmente como conseqüência da redução das atividades de enzimas chaves como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), responsáveis pela eliminação das EAOs. Em maçãs 'Fuji', as atividades dessas enzimas apresentaram um pico coincidindo com o aumento de produção de etileno, e depois diminuíram as suas atividades (MASIA, 1998).

MONDAL et al. (2004) observaram que o conteúdo de ácido ascórbico aumentou durante o amadurecimento de tomates em resposta ao estresse oxidativo. Esse aumento provavelmente coincidiu com o aumento climatérico da respiração durante o amadurecimento e, uma vez que a respiração é a principal fonte ativa de EAOs (RICH & BONNER, 1978), o climatério respiratório é provavelmente um contribuinte significante para o aumento do estresse oxidativo durante essa fase do desenvolvimento (MONDAL et al., 2004). Esses mesmos tomates apresentaram um progressivo aumento no estresse oxidativo durante os estádios iniciais do amadurecimento pelo aumento nas atividades das enzimas eliminadoras e nas concentrações das EAOs a serem eliminadas. Entretanto, nos estádios finais, o sistema antioxidante não foi eficiente para a eliminação de EAOs, conduzindo ao acúmulo das mesmas (MONDAL et al., 2004).

Com relação às EAOs, o conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi máximo em tomates verdes e exibiu somente um decréscimo marginal durante o amadurecimento. Isso pode ser atribuído à diminuição da atividade da SOD e ao aumento na atividade da CAT durante o amadurecimento (MONDAL et al., 2004).

LANCAN & BACCOU (1998) verificaram, em estudos com melões 'Jerac', que a atividade da SOD diminuiu durante o amadurecimento dos frutos. Em estudos com amoras pretas, WANG & JIAO (2001) verificaram existência da atividade da enzima nos estádios iniciais de amadurecimento, não encontrado em frutos maduros.

DU & BRAMLAGE (1995) encontraram um aumento na atividade da CAT em casca de maçã 'Golden Delicious' durante o armazenamento refrigerado. Já em tomates, a atividade

da SOD declinou constantemente dos estádios verde ao vermelho maduro (RABINOWITCH et al., 1982). Estudos têm demonstrado que a atividade da glutationa redutase (GR) também é reduzida com o progresso do amadurecimento, como verificado por WANG & JIAO (2001) em amoras pretas, e MONDAL et al. (2004) em tomates.

O aumento do estresse oxidativo que provavelmente resulta de menores atividades das enzimas é evidentemente necessário para facilitar muitas mudanças metabólicas associadas com o amadurecimento dos frutos (MONDAL et al., 2004). Um declínio na capacidade de eliminação dos radicais livres associado ao aumento do estresse oxidativo pode ser requisito para mediar muitas das mudanças físico-químicas que facilitam o amadurecimento dos frutos (ROGIERS et al., 1998).

A estreita correlação entre o etileno e o aumento nas atividades da CAT e da SOD é vaga e esse aumento nas atividades das enzimas está mais provavelmente relacionado: à rápida produção de oxidantes celulares no início do amadurecimento (BRENNAN & FRENKEL, 1977; LESHEM et al., 1986), ao aumento da peroxidação lipídica (HULME & RHODES, 1971; MEIR et al., 1991), e à redução nos níveis de poliaminas nos frutos que previnem a peroxidação lipídica por atuarem como eliminadoras de radicais livres (MASIA et al., 1998). Todas essas variações induzem aumentos em enzimas antioxidantes como a SOD e a CAT (FOYER et al., 1997). Também foi observado que o conteúdo de etileno aumenta simultaneamente com a peroxidação e com o decréscimo nas atividades da SOD e da CAT (ARORA et al., 2002).

A alta atividade de enzimas antioxidantes pode contribuir positivamente para uma maior vida pós-colheita. Altos níveis das atividades da CAT e da SOD em maçãs 'Golden Delicious' na colheita refletiram em um armazenamento refrigerado mais longo, quando comparado com as maçãs 'Fuji' (MASIA, 1998). LANCAN & BACCOU (1998), estudando duas variedades de melão, verificaram que os melões 'Cliper' apresentaram maior atividade de SOD e CAT, e menores concentrações de EAOs quando comparadas com melões 'Jerac'. Como conseqüência, os melões 'Cliper' apresentaram maior vida pós-colheita, tendo poucas alterações nos lipídios da membrana e na permeabilidade da membrana durante o amadurecimento e senescência em relação à outra variedade de melão.

Além do amadurecimento dos frutos, a senescência de tecidos verdes das plantas também é geralmente acompanhada pelo aumento nos conteúdos de malondialdeído (HODGES et al., 1999; YE et al., 2000), alta produção de EAOs (DEL RÍO et al., 1998) e perda gradual na habilidade das enzimas eliminadoras de neutralizar os radicais livres (KANAZAWA et al., 2000; PASTORI & DEL RÍO, 1997). Isso pode ser ilustrado pela

atividade da SOD que diminuiu durante a senescência em muitos sistemas vegetais resultando em um aumento do ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$) e, assim, no estresse oxidativo (DHINDSA et al., 1981); por aumentos nos danos peroxidativos mediados por radicais livres; e pela perda de integridade de membrana característica de tecidos de planta em senescência (DHINDSA et al., 1981; THOMPSON, 1984).

Também foi observado que a atividade da SOD decresceu durante a senescência das folhas de macieira (DHINDSA et al., 1981), mas aumentou durante a senescência de maçãs (DU & BRAMLAGE, 1994). DU & BRAMLAGE (1994) também demonstraram claramente que a atividade total da SOD e as atividades individuais de suas três metaloenzimas sofreram mudanças consideráveis durante a senescência de maçãs em armazenamento refrigerado.

Diante disso, o amadurecimento e a senescência de frutos podem ser considerados fenômenos oxidativos (BRENNAN & FRENKEL, 1977), especialmente no início da senescência, quando as atividades da SOD e de outras enzimas eliminadoras do oxigênio decrescem, permitindo que $O_2^{-\bullet}$ ou H_2O_2 acumulem-se em níveis tóxicos (BOWLER et al., 1992).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Genética e Bioquímica de Plantas e de Pós-Colheita de Produtos Hortícolas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP).

3.1 Material Vegetal

Foram utilizados mamões (*Carica papaya* L.) do grupo Solo, variedade 'Golden', no estádio de amadurecimento 1, ou seja, a cor amarela não cobria mais de 15% da superfície da casca (Figura 3), adquiridos em comércio local (Ceasa-Campinas).

Para os estudos com morango (*Fragaria x ananassa* Duch), foram utilizados frutos da cultivar 'IAC-Campinas' com 2/3 da superfície colorida (Figura 4), adquiridos em propriedade rural, em Valinhos-SP, diretamente com o produtor.

Figura 3 – Mamões 'Golden' no estádio de amadurecimento 1.

Figura 4 – Morangos 'IAC-Campinas' com 2/3 da superfície colorida.

3.2 Avaliações

Os frutos foram transportados até o laboratório de Pós-Colheita de Produtos Hortícolas da ESALQ-USP onde foram selecionados de acordo com o estádio de amadurecimento e ausência de defeitos. Os mamões e morangos foram armazenados em câmara com temperatura média de 22 ºC e umidade relativa média de 89%, avaliados diariamente durante 9 e 5 dias, respectivamente, quanto à respiração, produção de etileno, firmeza da polpa, cor da casca, peroxidação lipídica e atividades enzimáticas. Foram realizadas análises em dias alternados de ambos os frutos quanto à acidez titulável, teor de sólidos solúveis e de ácido ascórbico.

3.2.1 Cor da casca

A cor da casca dos mamões e dos morangos foi determinada com colorímetro (Minolta CR-300, Japão), tomando-se duas leituras por fruto na região de maior diâmetro. Os

resultados foram expressos em ºHue (ºH) para os mamões e em Chroma (C) para os morangos, considerando-se a média das duas leituras.

3.2.2 Sólidos solúveis

Os índices de refração de soluções aquosas de sacarose podem ser correlacionados com o seu teor de sacarose. Tem-se assim, uma correspondência entre índice de refração e porcentagem de sacarose, a qual se dá o nome de graus Brix (°Brix). Na prática, usa-se a leitura refratométrica, ou °Brix, para expressar sólidos solúveis. °Brix correspondem a gramas de sacarose para 100 g de solução e podem ser, de modo geral, usados para gramas de sólidos solúveis por 100 g de solução (CARVALHO et al., 1990).

Para a determinação dos sólidos solúveis, a polpa dos frutos foi centrifugada. Duas gotas desse suco foram colocadas no refratômetro digital (Atago PR-101, Japão) e duas leituras foram efetuadas, sendo o resultado final uma média, expresso em °Brix.

3.2.3 Acidez titulável

A acidez titulável mede a quantidade de ácido numa amostra. A acidez é calculada em ácido cítrico, málico ou tartárico, dependendo do tipo de ácido predominante na amostra. O método consiste em titular a acidez total com álcali, usando fenolftaleína como indicador ou potenciômetro (CARVALHO et al., 1990).

Para determinar a acidez titulável, a polpa dos frutos foi centrifugada até a obtenção de um suco. Pesou-se 10 g desse suco e acrescentou-se 90 mL de água destilada. Titulou-se com solução padrão de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N até que a solução atingisse pH 8,1, que é o ponto de virada da fenolftaleína. O resultado foi expresso em porcentagem (%) de ácido cítrico.

3.2.4 Ácido ascórbico

O teor de ácido ascórbico dos mamões e dos morangos foi determinado através da redução do 2,6-diclorofenol-indofenol sódio (DCFI) pelo ácido ascórbico, que tem forte ação redutora. O DCFI em meios básico e neutro é azul, em meio ácido é rosa e na forma reduzida é incolor. O ponto de viragem é determinado pela mudança de cor, de incolor para rosa, quando todo ácido ascórbico já foi oxidado pelo DCFI (CARVALHO et al., 1990).

Para as análises, a polpa dos frutos foi centrifugada. 5 g do suco de mamão e 10 g do de morango foram adicionados em 25 mL e 90 mL de ácido oxálico 1%, respectivamente. A solução padrão foi obtida com 5 mL de ácido ascórbico e 25 mL de ácido oxálico 1% para mamão e com 10 mL de ácido ascórbico e 90 mL de ácido oxálico 1% para morango. Essas misturas foram tituladas com DCFI até coloração rosada persistente das misturas por 15 s e os resultados obtidos foram expressos em mg de ácido ascórbico por 100 g de polpa.

3.2.5 Firmeza da polpa

A firmeza da polpa foi avaliada com penetrômetro digital (53200 Tr Turoni, Itália), com ponteira de 8 mm para mamão e de 6 mm para morango, tomando-se uma leitura na região de maior diâmetro dos frutos. Para os mamões, retirou-se parte da casca (camada fina). Posteriormente, apoiaram-se firmemente os mamões e os morangos sobre a bancada e introduziu-se a ponteira até o seu friso, aplicando força constante. A leitura foi feita diretamente e os dados expressos em Newtons (N).

3.2.6 Respiração e produção de etileno

Para as determinações de respiração e produção de etileno, os mamões e morangos, com massa conhecida, foram colocados em recipientes herméticos de vidro com capacidade de 1700 mL para mamão e de 590 mL para morango, previamente expostos às condições de temperatura e umidade do experimento. Após 1 h, amostras de 1 mL de gás foram coletadas dos recipientes através de um septo de silicone, com auxílio de uma seringa (Hamilton, Gastight, EUA). As amostras de gases foram analisadas em cromatógrafo Thermo Finnigan Trace 2000GC (Itália). O cromatógrafo foi equipado com coluna capilar Porapack N, com 2 m de comprimento e regulada para 80 °C, com hidrogênio como gás de arraste (40 mL min^{-1}). Para as análises de respiração (CO_2) foi utilizado metanador a 350 °C e, para as de etileno (C_2H_4), este foi desnecessário. As amostras de gases foram analisadas por um detector de ionização de chama a 250 °C. A respiração e a produção de etileno foram determinadas pela diferença entre a concentração gasosa inicial (quando os frascos foram fechados) e final (após 1 h), sendo expressas em mL de CO_2 kg^{-1} h^{-1} e μL de C_2H_4 kg^{-1} h^{-1}, respectivamente.

3.2.7 Peroxidação lipídica

A peroxidação de lipídios foi avaliada através da produção de metabólitos reativos ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente o malondialdeído (MDA) (MIHARA et al., 1980). Para tanto, 1,0 g da polpa e 0,5 g da casca dos mamões foram macerados em 4,5 e 2,3 mL, respectivamente, de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1% juntamente com 20% de polivinilpolipirrolidona (PVPP). As amostras de morango (0,3 g) também foram maceradas em 1,5 mL da mesma solução citada para o mamão.

Após perfeita homogeneização, 1,4 mL dessas amostras foram centrifugadas a 12.100 *g*, por 5 min. Do sobrenadante, foi retirado 250 μL ao qual foi adicionado 1 mL de TCA 20% e TBA 0,5%. A mistura foi colocada em banho-maria por 30 min, a 95 ºC e resfriada em gelo, na sequência. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas novamente por 10 min a 12.100 *g*, com o objetivo de separar resíduos que podiam ter permanecido ou terem sido formados durante o aquecimento das amostras. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a 535 e 600 ηm. A quantidade de MDA foi expressa em mM de MDA g^{-1} de tecido fresco, usando um coeficiente de extinção da reação de 155 mM cm^{-1}.

3.2.8 Extração de proteínas

Foram retiradas amostras de polpa e de casca da porção mediana dos mamões e, também, amostras de polpa da porção mediana dos morangos. Posteriormente, estas foram maceradas em N_2 líquido até ficarem com o aspecto de farinha. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 (proporção de 1 g de amostra: 2 mL de tampão), contendo 1 mM ácido etileno diamino tetracético (EDTA), 3 mM ditiotreitol (DTT) e 4% (p/v) polivinilpolipirrolidona (PVPP) de acordo com AZEVEDO et al. (1998). O homogeneizado foi centrifugado a 12.100 *g* por 30 min a 4 ºC, utilizando centrífuga Beckmam modelo J2-MC.

O sobrenadante foi coletado, dividido em alíquotas e estocado em freezer -80 ºC até o momento das análises enzimáticas, enquanto se descartou o precipitado. Posteriormente, foram realizados ensaios de atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutationa redutase (GR) em géis não desnaturantes (PAGE) e atividade das enzimas catalase (CAT), GR e ascorbato peroxidase (APX) em espectrofotômetro.

3.2.9 Determinação de proteína total solúvel

A concentração das proteínas totais nos extratos foi determinada segundo o método de BRADFORD (1976), utilizando-se o BSA ("bovine serum albumin") como padrão. Foi utilizado o espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, com leitura a 595 ηm. Os valores foram determinados utilizando-se uma curva padrão de concentrações conhecidas de BSA através de regressão linear. O resultado da quantificação se deu em mg mL^{-1}.

3.2.10 Catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT) foi determinada por espectrofotometria como descrito por KRAUS et al. (1995) com algumas modificações, conforme AZEVEDO et al. (1998).

Em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a CAT foi determinada a 25 °C em solução contendo 10 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 25 µL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 25%, preparada imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição de 35 µL de extrato protéico e a atividade determinada seguindo-se a decomposição de H_2O_2 por 1 min, através das alterações na absorbância a 240 ηm. Os resultados foram expressos em µmol min^{-1} mg^{-1} de proteína.

3.2.11 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada unicamente em gel não desnaturante (PAGE), realizada através dos extratos protéicos dos frutos, cujas proteínas foram separadas por eletroforese em gel 12% (AZEVEDO et al., 1998). Foi utilizado o sistema Mini Protean II da Bio-Rad. O gel possuía espessura de 1,5 mm, altura de 6,5 cm e largura de 7,3 cm. Para a confecção de um mini gel foi utilizado 3,0 mL de uma solução 40% de acrilamida (Sigma), 2,5 mL de tampão TRIS (hidroximetil-aminometano) 3 M (pH 8,9) e 4,5 mL de água destilada. Como catalisadores foram utilizados 19 µL de TEMED e 25 µL de persulfato de amônio (1%). Após a polimerização desse gel de resolução (cerca de 30 min), foi aplicado o gel de empacotamento segundo o protocolo: 500 µL de acrilamida, 1,25 mL tampão TRIS 500 mM (pH 6,7) e 2,75 mL de água. Para a polimerização foram utilizados 10 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônio (1%).

A eletroforese foi realizada a 4 °C em corrente constante de 15 mA/placa. O tampão de eletrodo foi TRIS 25 mM (pH 8,3) acrescido de 192 mM de glicina – 5x concentrado, sendo diluído para 1x e reutilizado até 3 vezes. Amostras do padrão de SOD de fígado de boi (Sigma – 2 unidades) e 20 μg de proteína dos extratos dos frutos foram aplicadas para cada gel. Após a separação das proteínas por eletroforese, a atividade da SOD foi determinada de acordo com GOMES-JUNIOR et al. (2006).

Os géis foram lavados rapidamente em água deionizada e incubados no escuro a temperatura ambiente em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 1 mM ácido etileno diamino tetracético (EDTA), 0,05 mM riboflavina, 0,1 mM nitroblue tetrazolium (NBT) e 0,3% TEMED. Ao final de 30 min, a mistura de reação foi removida, os géis enxaguados com água deionizada e colocados sob iluminação por alguns minutos até o desenvolvimento de bandas brancas sob fundo roxo. Nestas condições ocorre a foto-oxidação do gel, propiciando a formação de uma coloração púrpura e as bandas correspondentes à atividade de SOD permanecem sem se foto-oxidar, promovendo uma revelação negativa. A foto-oxidação foi interrompida mergulhando-se o gel em solução de ácido acético (7%) por 15 min. Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

3.2.11.1 Determinação das isoformas de SOD

Para a determinação das isoformas de SOD foi realizada eletroforese com 100 μg de proteína, nas mesmas condições descritas anteriormente para SOD (item 3.2.11). Ao final da eletroforese, o gel foi dividido verticalmente em três partes iguais. A primeira parte foi mantida a 4 °C em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8. A segunda foi imersa em 100 mL do mesmo tampão contendo 2 mM de cianeto de potássio (KCN) e 0,0292 g de ácido etileno diamino tetracético (EDTA). A terceira, imersa em 100 mL do referido tampão contendo 5 mM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e 0,0292 g de EDTA. Todos os passos descritos foram realizados no escuro. Após 20 min nestas soluções, os géis foram submetidos à revelação com nitroblue tetrazolium (NBT) e riboflavina, como citado anteriormente no item 3.2.11. Ao final da revelação, foi analisada a presença ou ausência de bandas no controle, e nos tratamentos com KCN e H_2O_2. As isoformas foram então classificadas como Mn-SOD, Fe-SOD ou Cu/Zn-SOD. Mn-SOD é resistente a ambos inibidores (KCN e H_2O_2),

Fe-SOD é resistente ao KCN e inibida por H_2O_2 e Cu/Zn-SOD é inibida por ambas as substâncias (AZEVEDO et al., 1998).

3.2.12 Glutationa redutase (GR)

A atividade da glutationa redutase (GR) foi determinada por espectrofotometria e em gel não desnaturante (PAGE).

Em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a atividade da GR foi determinada como descrito por GOMES-JUNIOR et al. (2006), com algumas modificações, a 30 °C, em uma mistura de reação consistindo de 1 mL tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), contendo 1 mM 2-ácido nitrobenzóico (DTNB), 1 mM glutationa oxidada (GSSG) e 0,1 mM NADPH. A reação foi iniciada pela adição de 50 μL de extrato protéico. A atividade da GR foi estimada pela redução da GSSG acompanhada por monitoramento na alteração da absorbância a 412 ηm por 1 min. Os resultados foram expressos em μmol min^{-1} mg^{-1} de proteína.

A atividade da GR também foi determinada em PAGE. Foi realizada eletroforese em gel não desnaturante (PAGE) (12%) nas mesmas condições como descrito para SOD (item 3.2.11). Amostras do padrão de GR de fígado de boi (Sigma – 1 unidade) e 20 μg de proteína dos extratos protéicos dos frutos foram aplicadas para cada gel. Após a separação das proteínas por eletroforese, a atividade da GR foi determinada como descrito por LEE & LEE (2000). Após a corrida, os géis foram lavados em água deionizada (2 x 15 min) e incubados a temperatura ambiente por 30 min em uma solução de 0,25 M de hidroximetil-aminometano (TRIS) (pH 7,5), 10 mg de 3(4,5-dimetiltiazol-2-4)-2,5-difenil brometo tetrazólico (MTT), 10 mg de 2,6-diclorofenolindofenol (DPIP); 3,4 mM GSSG e 0,5 mM NADPH para 50 mL de água. O gel foi lavado rapidamente em água deionizada e a reação foi fixada em solução de ácido acético (7%) por 15 min. Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

3.2.13 Ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada unicamente por espectrofotometria, de acordo com o método de NAKANO & ASADA (1981), com algumas

modificações, sendo que a presença da APX no extrato bruto diminui a concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) do meio, pela redução do ácido ascórbico fornecido.

Em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a APX foi determinada a 30 °C em uma mistura de reação consistindo de 650 µL tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 7,0), 100 µL estoque ascorbato e 100 µL estoque EDTA (ácido etileno diamino tetracético). O tampão fosfato de potássio e os estoques de ascorbato e EDTA foram mantidos em banho-maria a 30 ºC durante o ensaio. A solução estoque de ascorbato foi realizada com o próprio tampão fosfato mais a adição de ácido ascórbico (ascorbato) 5 mM. A solução de EDTA foi feita também com o próprio tampão fosfato mais a adição de EDTA 1 mM. Foi adicionado 100 µL de H_2O_2 (1 mM) e 50 µL do extrato protéico dos frutos ao meio de reação fora do banho, totalizando um volume final de 1 mL, no momento da leitura.

Foi observado o decréscimo da leitura no intervalo de 60 s à absorbância de 290 ηm. Foi considerado que o decréscimo de uma unidade de absorbância é equivalente a uma unidade de atividade (UA). As atividades do extrato foram determinadas pelo cálculo da quantidade de extrato que reduz a leitura de absorbância em uma UA e expressas em µmol min^{-1} mg^{-1} de proteína, usando o coeficiente de extinção de 2,8 mM cm^{-1}.

3.3 Delineamento Experimental e Análise dos Resultados

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Para todas as análises foram utilizadas três repetições. Para as análises realizadas com mamão, cada repetição foi constituída por um fruto. Para as análises realizadas com morango, foram utilizados 250 g de fruto por repetição. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de média foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR.

4 RESULTADOS

4.1 Respiração e Produção de Etileno

A produção de etileno nos mamões aumentou significativamente ($P \leq 0,05$) no segundo dia de armazenamento (6,3 µL de C_2H_4 kg^{-1} h^{-1}) (Figura 5), coincidindo com um acréscimo na respiração desses frutos (Figura 6), que atingiram aos três dias cerca de 22,0 mL

de CO_2 kg^{-1} h^{-1}. Com o progresso do amadurecimento, a produção de etileno e a respiração decresceram até o sexto dia de armazenamento, quando então houve um novo aumento na respiração (Figura 6), atingindo novamente valores próximos a 22 mL de CO_2 kg^{-1} h^{-1}($P \leq 0,05$).

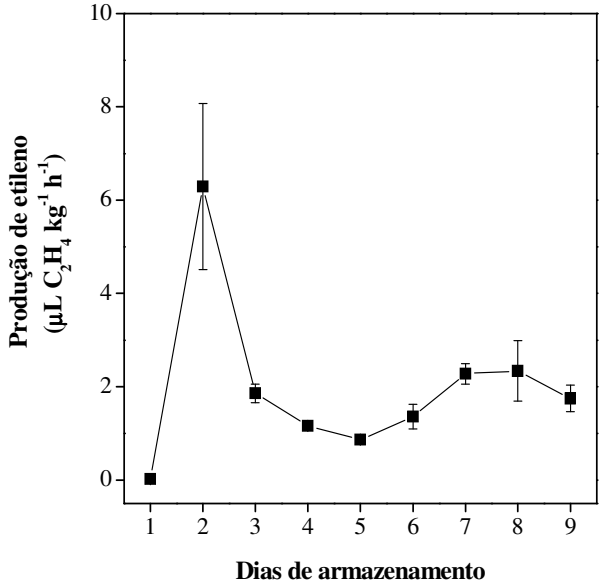


Figura 5 – Produção de etileno em mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3).

Nos morangos, a produção de etileno foi bem mais baixa quando comparada aos mamões. A produção de etileno atingiu valores médios de 0,032 µL de C_2H_4 kg^{-1} h^{-1} nos dois primeiros dias de armazenamento (Figura 7), dois dias antes do aumento na respiração dos frutos, que após o quarto dia apresentou valores médios de 25,2 mL de CO_2 kg^{-1} h^{-1} (Figura 8). Com o progresso do amadurecimento, a produção de etileno decresceu enquanto que a respiração se manteve ao redor de 25,2 mL de CO_2 kg^{-1} h^{-1} até o final das análises.

Comparando a respiração e a produção de etileno dos dois frutos estudados, podemos observar que o mamão apresentou pico de produção de etileno logo no início do amadurecimento (Figura 5) e dois picos de respiração, no terceiro e no oitavo dias de armazenamento (Figura 6). Já os morangos apresentaram decréscimo na produção de etileno durante os dias analisados (Figura 7) e aumento da respiração após o terceiro dia de armazenamento (Figura 8). Além disso, a respiração dos mamões praticamente dobrou,

variando de 11,0 até 21,8 mL de CO_2 kg^{-1} h^{-1} (Figura 6) e a produção de etileno aumentou cerca de seis vezes, de 0,02 até 6,3 μL de C_2H_4 kg^{-1} h^{-1} (Figura 5) durante o processo de amadurecimento. Nos morangos, a variação da respiração foi bem menos expressiva. Nos primeiros três dias, a respiração média era de 22,4 mL de CO_2 kg^{-1} h^{-1}, atingindo valores médios de 25,2 mL de CO_2 kg^{-1} h^{-1} no final do amadurecimento (Figura 8). A produção de etileno dos morangos diminuiu aproximadamente sete vezes, variando de 0,005 a 0,033 μL de C_2H_4 kg^{-1} h^{-1} (Figura 7) durante o amadurecimento.

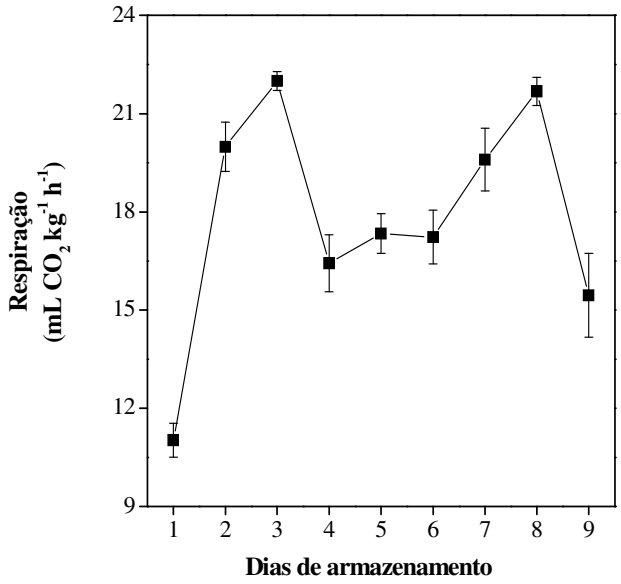


Figura 6 – Respiração em mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3).

4.2 Atividade da Catalase em Espectrofotômetro

Com relação à atividade da enzima catalase (CAT) nos mamões, desde o início do amadurecimento, esta foi maior na casca quando comparada à polpa do fruto. Na polpa, um pico de atividade da CAT ($P \leq 0,05$) foi observado aos três dias (70,2 μmol min^{-1} mg^{-1} de proteína), seguido por um decréscimo na atividade aos quatro dias de armazenamento. Um novo aumento na atividade foi observado aos seis dias de armazenamento com valores de 81,9 μmol min^{-1} mg^{-1} de proteína (Figura 9).

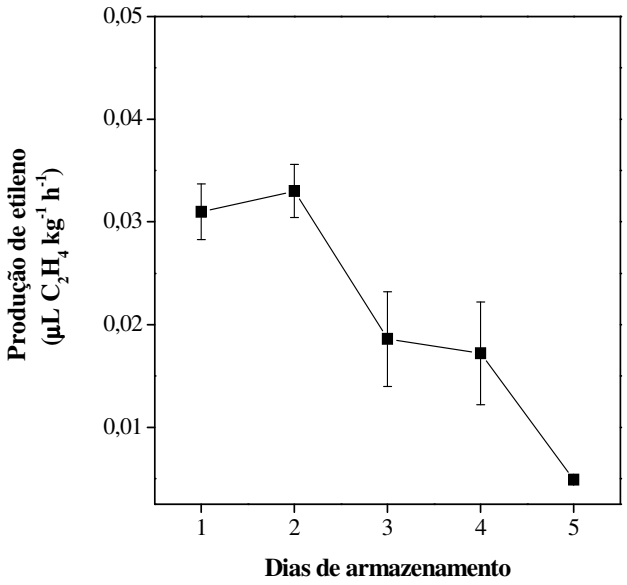


Figura 7 – Produção de etileno em morangos 'IAC-Campinas' armazenados por 5 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3).

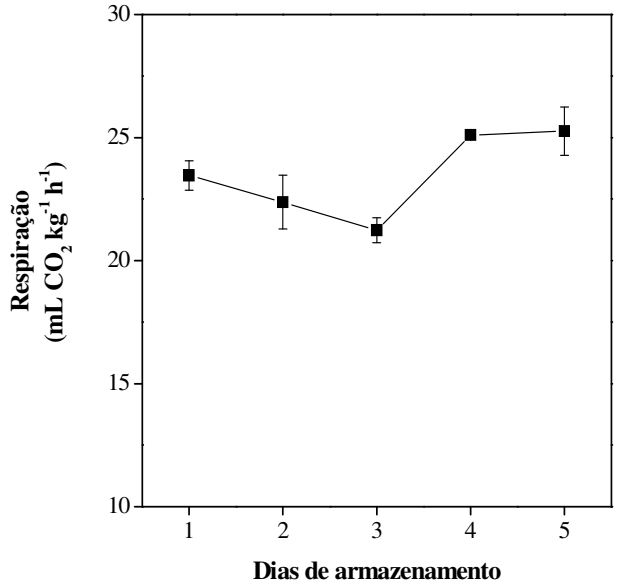


Figura 8 – Respiração em morangos 'IAC-Campinas' armazenados por 5 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3).

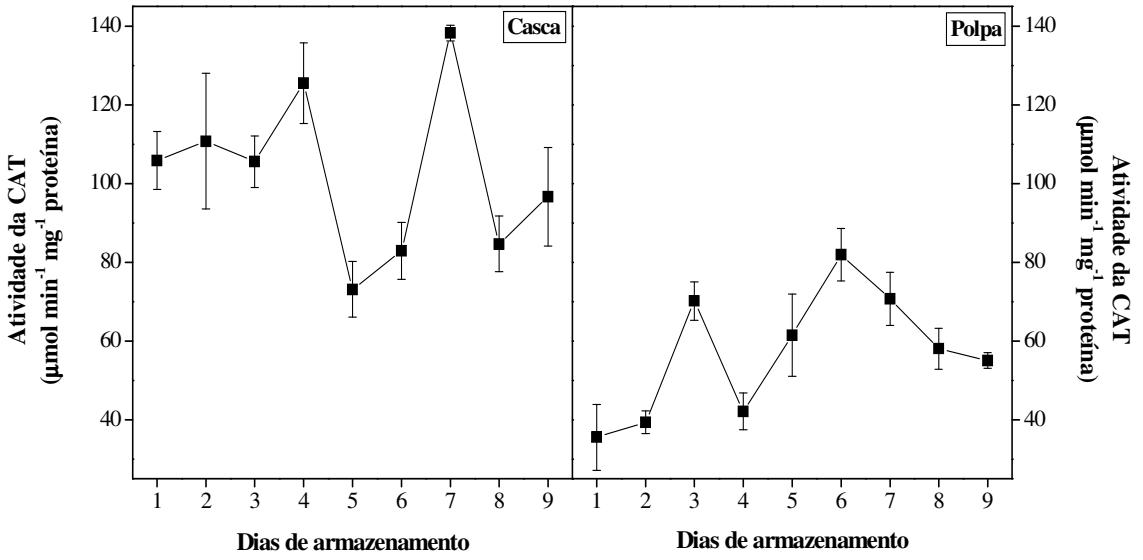


Figura 9 – Atividade da catalase (CAT) em mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3).

Durante os quatro primeiros dias, a atividade da CAT se manteve alta, ao redor de 111,9 µmol min^{-1} mg^{-1} de proteína na casca dos mamões. Foi observada diminuição na atividade enzimática entre o quinto e sexto dias de armazenamento, quando então um pico foi observado no sétimo dia, com valores de 138,2 µmol min^{-1} mg^{-1} de proteína ($P \leq 0,05$) (Figura 9).

As amostras de morango, quando submetidas aos ensaios de atividade enzimática da CAT, glutationa redutase (GR) e ascorbato peroxidase (APX), não apresentaram leitura e cinética estáveis, ou seja, não foi possível estabelecer uma cinética enzimática para essas amostras, não sendo válidos os resultados obtidos.

Foram feitas alterações nos protocolos de análise, variando as quantidades de amostras aplicadas, na tentativa de se obter uma leitura estável. No entanto, a instabilidade das leituras permaneceu, não sendo possível determinar as atividades dessas enzimas utilizando o espectrofotômetro. Isso provavelmente ocorreu devido às baixas atividades enzimáticas presentes nas amostras de morango, não sendo detectadas espectrofotometricamente, ou por problemas na extração. Para solucionar esse problema, pretendem-se usar, no futuro, outros protocolos de extração de proteínas, além da utilização de métodos de purificação e concentração de proteínas.

4.3 Atividade da Glutationa Redutase em Espectrofotômetro e em PAGE

Nos primeiros quatro dias de armazenamento, a atividade da enzima glutationa redutase (GR) se mostrou estável na casca de mamões, com valores médios de 4,7 μmol min^{-1} mg^{-1} de proteína (Figura 10). No quinto dia de armazenamento, essa atividade apresentou um declínio abrupto ($P \leq 0,05$), atingindo valor de 2,0 μmol min^{-1} mg^{-1} de proteína. A partir do sexto dia de armazenamento, a atividade enzimática voltou a aumentar atingindo novamente valores próximos a 4,5 μmol min^{-1} mg^{-1} de proteína. Na polpa, ao contrário do que aconteceu na casca, observou-se um pico ($P \leq 0,05$) de atividade enzimática. A atividade da GR atingiu um pico no terceiro dia de armazenamento (6,7 μmol min^{-1} mg^{-1} de proteína), decrescendo no quarto dia e aumentando novamente a partir do quinto dia, com valores médios de 4,1 μmol min^{-1} mg^{-1} de proteína até o final das análises (Figura 10).

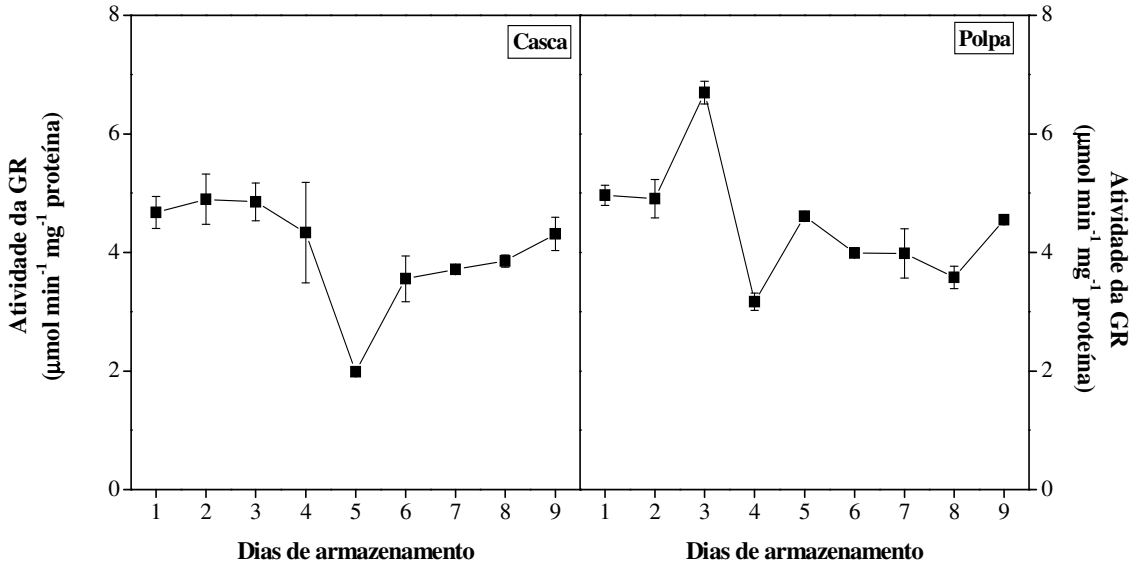


Figura 10 – Atividade da glutationa redutase (GR) em mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3).

Em análise de atividade da GR em gel de poliacrilamida não desnaturante (PAGE) para as amostras de casca de mamão, observou-se uma maior intensidade das bandas nos primeiros quatro dias de armazenamento (Figura 11). No quinto dia de armazenamento, foi observada menor intensidade das bandas, sendo esta aumentada no sexto dia em diante. Esse

comportamento enzimático, observado em PAGE, coincidiu com a atividade avaliada em espectrofotômetro. Em ambas as amostras (casca e polpa) notou-se o aparecimento do mesmo número de isoformas de GR (Figura 11). Com relação à intensidade das bandas das isoformas visualizadas nas amostras de polpa dos mamões, observou-se que as isoformas I e II praticamente não diferiram em intensidade durante os nove dias de armazenamento. Já a isoforma III apresentou-se com intensidade variada durante os dias analisados (Figura 11).

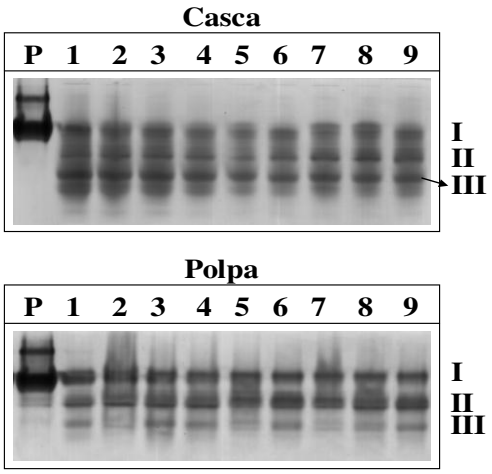


Figura 11 – Atividade da glutationa redutase (GR) em PAGE em mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Padrão (P) GR bovino; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 representam os dias de armazenamento dos frutos. Algarismos romanos representam as isoformas de GR.

Em análise de atividade da GR em PAGE para as amostras de morango, observou-se maior intensidade das bandas nos dois últimos dias de armazenamento (Figura 12). No primeiro e no terceiro dias de armazenamento, foi observada menor intensidade das bandas, sem a visualização da isoforma I.

4.4 Atividade da Superóxido Dismutase em PAGE

Os resultados em PAGE para a enzima superóxido dismutase (SOD) em mamões demonstraram variações na atividade durante o amadurecimento dos frutos (Figura 13). Tanto as amostras de casca quanto as de polpa apresentaram cinco isoenzimas (I, II, III, IV e V).

A atividade da SOD não variou significativamente na polpa dos mamões, apresentando intensidade de bandas semelhantes durante os nove dias de armazenamento

(Figura 13). Já na casca dos frutos, observou-se redução de atividade no quinto dia de armazenamento (Figura 13), com a ausência de bandas para as isoenzimas I e II. A partir do sexto dia de armazenamento, a atividade enzimática apresentou-se similar aos primeiros dias de amadurecimento dos frutos. Além disso, pode-se notar maior atividade das isoenzimas III e IV, caracterizada pelas maiores intensidades das bandas, quando comparadas às isoenzimas I, II e V, tanto na polpa quanto na casca dos mamões (Figura 13).

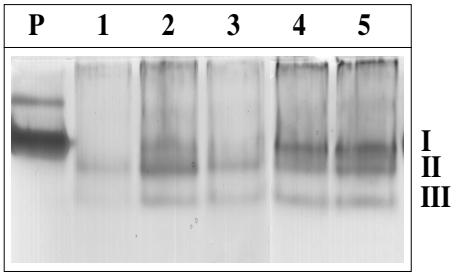


Figura 12 – Atividade da glutationa redutase (GR) em PAGE em morangos 'IAC-Campinas' armazenados por 5 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Padrão (P) GR bovino; 1, 2, 3, 4 e 5 representam os dias de armazenamento dos frutos. Algarismos romanos representam as isoformas de GR.

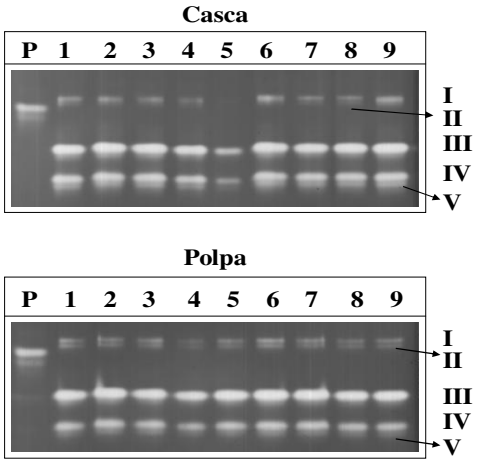


Figura 13 – Atividade da superóxido dismutase (SOD) em PAGE em mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Padrão (P) SOD bovino; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 representam os dias de armazenamento dos frutos. Algarismos romanos representam as isoformas de SOD.

Para caracterização das isoformas de SOD (Figura 14), foi utilizada somente a amostra relativa ao sétimo dia de armazenamento, pois, tanto as amostras de casca quanto as de polpa, apresentaram o mesmo padrão de bandas, como observado na figura 13. Foi observado o aparecimento de SOD com co-fator Cu/Zn, pois as bandas foram inibidas nas soluções com cianeto de potássio (KCN) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tanto para as amostras de polpa quanto para as de casca do mamão. As isoenzimas Fe-SOD e Mn-SOD não foram encontradas, indicando que a atividade da SOD em mamão é dada exclusivamente pela isoenzima Cu/Zn-SOD (Figura 14).

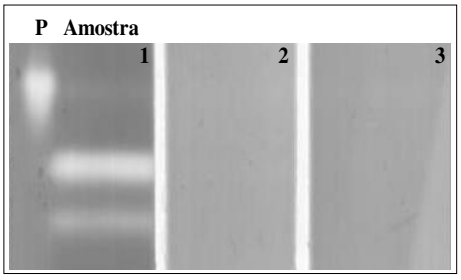


Figura 14 – Caracterização das isoformas da superóxido dismutase (SOD) em PAGE em mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Padrão (P) SOD bovino; 1 = Controle; 2 = Presença de KCN; 3 = Presença de H_2O_2.

A atividade da SOD nos morangos não variou significativamente entre o 1º, 2º, 4º e 5º dias avaliados, apresentando intensidade de bandas semelhantes (Figura 15). Entretanto, podemos notar menor intensidade das bandas do terceiro dia de armazenamento. Diferentemente do mamão, as amostras de morango apresentaram um padrão com três isoformas (I, II e III) de SOD.

Para as amostras de morango em PAGE, a SOD apresentou bandas com baixa intensidade, mesmo usando uma grande quantidade de proteína. Com isso, a caracterização das isoformas de SOD não foi feita devido à baixa intensidade das bandas dessa enzima e também à grande quantidade de amostra a ser utilizada para se obter um resultado satisfatório.

4.5 Atividade da Ascorbato Peroxidase em Espectrofotômetro

A atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) foi detectada somente na polpa dos mamões. Observou-se um acréscimo gradual na atividade enzimática, atingindo um valor

máximo no oitavo dia (2823,48 μmol min^{-1} mg^{-1} de proteína) ($P \leq 0,05$). Após esse dia, a atividade da APX diminuiu acentuadamente (Figura 16).

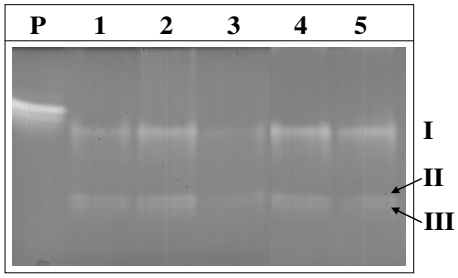


Figura 15 – Atividade da superóxido dismutase (SOD) em PAGE em morangos 'IAC-Campinas' armazenados por 5 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Padrão (P) SOD bovino; 1, 2, 3, 4 e 5 representam os dias de armazenamento dos frutos. Algarismos romanos representam as isoenzimas de SOD.

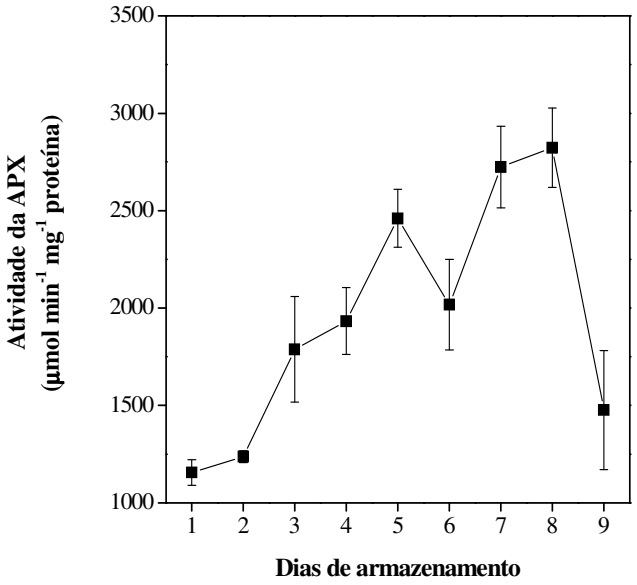


Figura 16 – Atividade da ascorbato peroxidase (APX) na polpa de mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3).

As amostras de casca dos mamões, quando submetidas aos ensaios de atividade enzimática da APX, também não apresentaram estabilidade na leitura e cinética, como foi visto para as amostras de morango.

Foram feitas alterações nos protocolos de análise, variando as quantidades de amostras aplicadas, na tentativa de se obter um resultado estável. No entanto, a instabilidade das amostras permaneceu, não sendo possível definir a atividade enzimática da APX utilizando o espectrofotômetro. Isso provavelmente ocorreu devido à baixa atividade enzimática presente nas amostras de casca dos mamões, não sendo detectada espectrofotometricamente. Além disso, devido à presença de alta atividade da catalase (CAT) na casca dos mamões, é possível que esta região do fruto apresente pouca afinidade para a APX, já que estas duas enzimas utilizam o mesmo substrato (H_2O_2).

4.6 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica, expressa através da quantificação de malondialdeído (MDA), se manteve baixa durante os três primeiros dias de amadurecimento tanto na casca quanto na polpa dos mamões. No quarto dia de armazenamento, a peroxidação lipídica atingiu um pico (1,12 mM MDA g^{-1} massa fresca) ($P \leq 0,05$) na polpa dos frutos, voltando a apresentar, aos nove dias, valores próximos aos do início do amadurecimento (0,55 mM MDA g^{-1} massa fresca) (Figura 17). Na casca dos mamões não foi observado pico evidente como na polpa. Nesse caso constataram-se dois períodos de aumento na peroxidação lipídica no quinto dia (0,61 mM MDA g^{-1} massa fresca) e depois no sétimo dia (0,83 mM MDA g^{-1} massa fresca) de armazenamento ($P \leq 0,05$). Aos nove dias de armazenamento, a peroxidação lipídica na casca apresentou redução significativa enquanto que na polpa a tendência, aos nove dias, era de aumento na peroxidação lipídica (Figura 17).

A peroxidação lipídica no morango não foi realizada com sucesso devido a pouca ou nenhuma formação de malondialdeído (MDA), mesmo este podendo ser superestimado pela presença de pigmentos tipo fenilpropanóides (flavonóides) (HODGES et al., 1999), presentes em tecidos vegetais (HARBORNE, 1998), que podem contribuir para a absorbância a 532 ηm (STAFFORD, 1994), como é o caso dos morangos, frutos ricos em antocianinas, metabólitos pertencentes à classe dos flavonóides (AABY et al., 2005). Supõe-se que os morangos formem outras substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), que não seja o MDA.

Portanto, será necessário um estudo detalhado da bioquímica desse fruto para se conhecer a sua composição e quantificar a peroxidação lipídica.

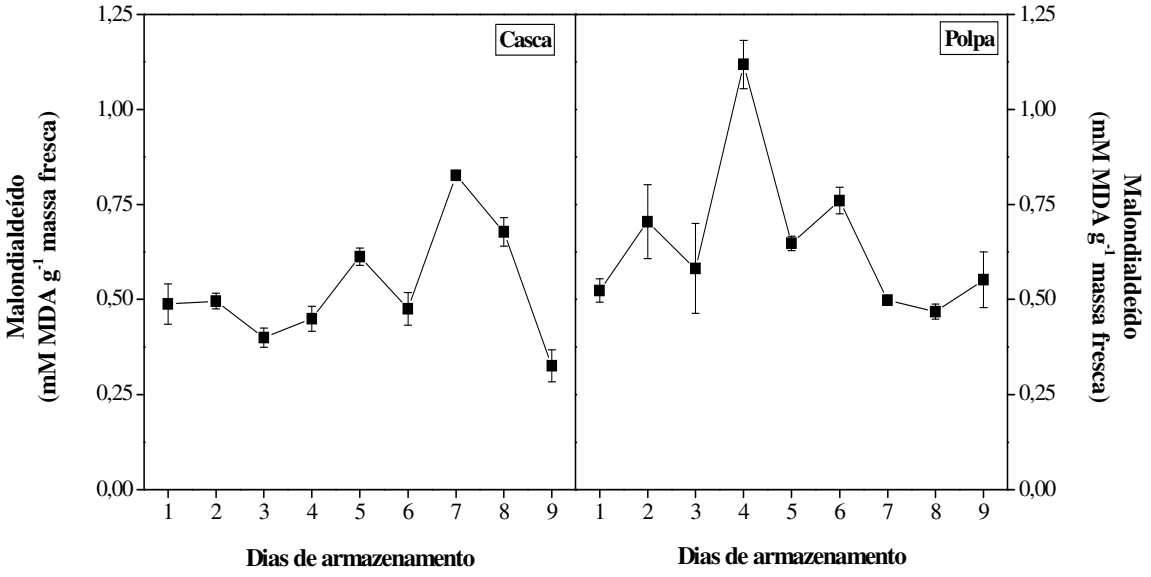


Figura 17 – Quantidade de malondialdeído (MDA) em mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3).

4.7 Firmeza e Coloração dos Frutos

Observou-se decréscimo acentuado da firmeza da polpa dos mamões (Figura 18) até o terceiro dia de armazenamento, de 114,5 N para 15,8 N ($P \leq 0,05$). Nos morangos, a perda de firmeza não foi tão intensa como nos mamões, mostrando redução de 6,7 N, no primeiro dia ($P \leq 0,05$) (Figura 19), para 5,7 N, no quinto dia de armazenamento.

A cor da casca dos mamões (Figuras 20 e 21) e morangos (Figuras 22 e 23) variou significativamente, apresentando redução no ângulo de cor de 105,9 para 80,9 ºH ($P \leq 0,05$) durante o amadurecimento de mamões e redução na cromaticidade de 29,5 para 24,2 ($P \leq 0,05$) nos morangos.

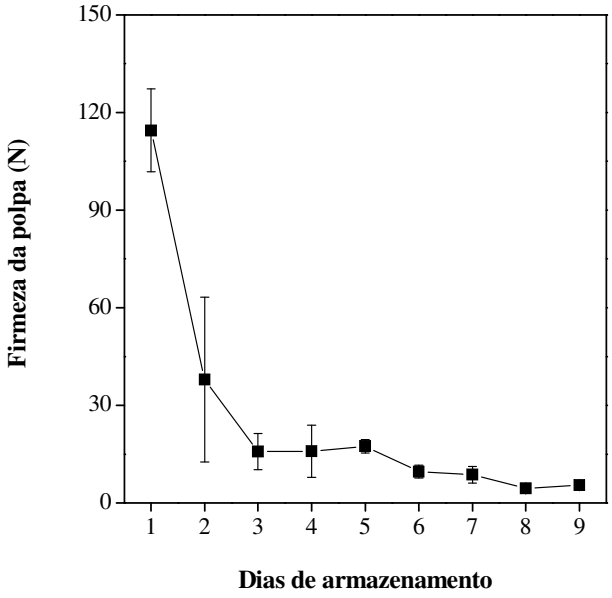


Figura 18 – Firmeza da polpa de mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3).

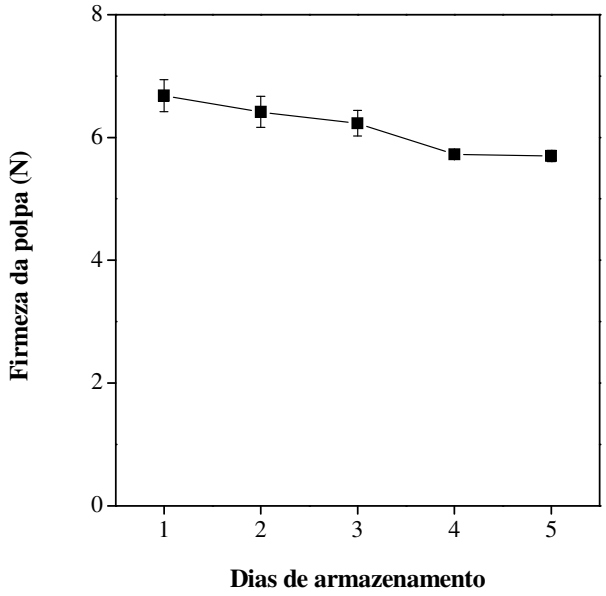


Figura 19 – Firmeza da polpa de morangos 'IAC-Campinas' armazenados por 5 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3).

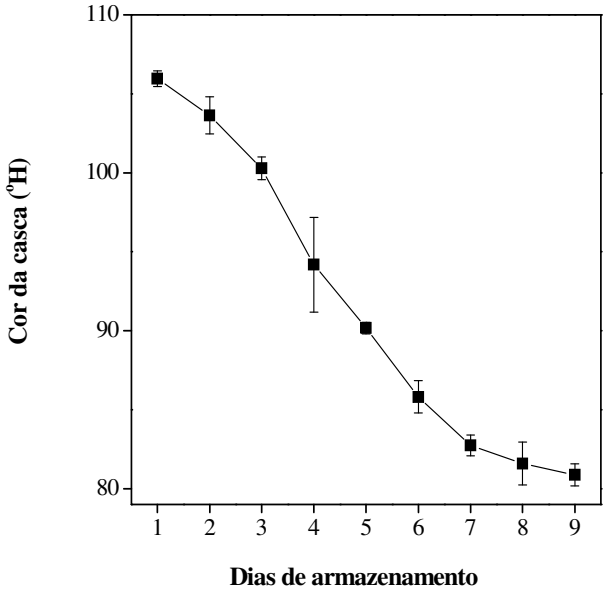


Figura 20 – Cor da casca de mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3).

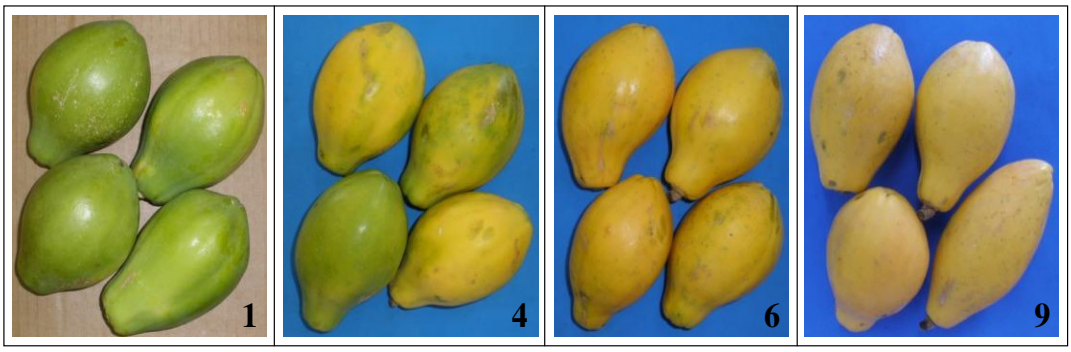


Figura 21 – Cor da casca de mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Números indicam o período de armazenamento dos frutos, em dias.

4.8 Análises Químicas

Não houve variação no teor de sólidos solúveis (SS) dos mamões ao longo do amadurecimento. Os valores médios de SS foram de 10,9 ºBrix (Tabela 1). Houve pequeno aumento na acidez titulável, de 0,08 a 0,10% de ácido cítrico ($P \leq 0,05$), e aumento nos teores de ácido ascórbico durante o amadurecimento (Tabela 1). O teor de ácido ascórbico aumentou

significativamente ($P \leq 0,05$) com o amadurecimento dos frutos, atingindo valores de 96,3 mg de ácido ascórbico 100^{-1} g de polpa, ou seja, quase duas vezes maior que no início do amadurecimento.

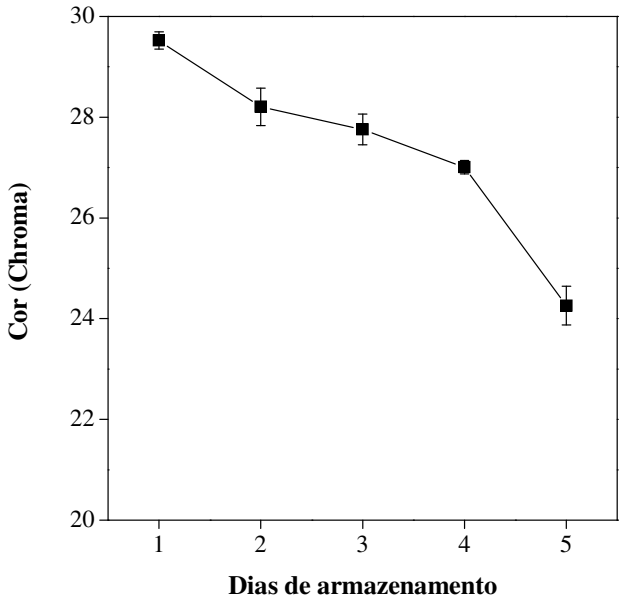


Figura 22 – Cor de morangos 'IAC-Campinas' armazenados por 5 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3).

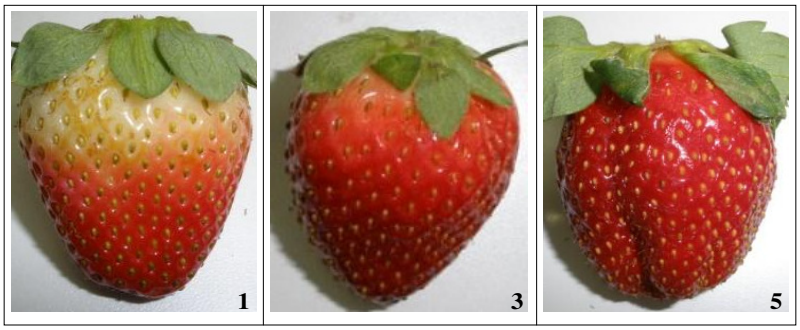


Figura 23 – Cor de morangos 'IAC-Campinas' armazenados por 5 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%. Números indicam o período de armazenamento dos frutos, em dias.

Para morangos, não houve variação no teor de sólidos solúveis (SS) ao longo do amadurecimento (Tabela 2). Os valores médios de SS foram de 6,7 ºBrix. Houve pequeno

aumento na acidez titulável, variando de 0,79 a 0,94% de ácido cítrico ($P \leq 0,05$) e, ao contrário do mamão, houve diminuição significativa ($P \leq 0,05$) nos teores de ácido ascórbico durante o amadurecimento, de 50,6 para 44,0 mg de ácido ascórbico 100^{-1} g de polpa (Tabela 2).

Tabela 1 – Sólidos solúveis, acidez titulável e teor de ácido ascórbico em mamões 'Golden' armazenados por 9 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%.*

	Dias					CV (%)
	1	3	5	7	9	
Sólidos Solúveis (^{o}Brix)	10,7 a	11,2 a	10,6 a	10,8 a	10,9 a	2,6
Acidez Titulável (% ácido cítrico)	0,08 b	0,10 a	0,10 a	0,10 a	0,10 a	3,2
Ácido Ascórbico (mg 100^{-1} g polpa)	52,8 c	82,3 bc	91,4 a	90,4 ab	96,3 a	3,5

*Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n = 3).

Tabela 2 – Sólidos solúveis, acidez titulável e teor de ácido ascórbico em morangos 'IAC-Campinas' armazenados por 5 dias a 22 ºC e umidade relativa média de 89%.*

	Dias			CV (%)
	1	3	5	
Sólidos Solúveis (^{o}Brix)	6,6 a	6,9 a	6,6 a	3,2
Acidez Titulável (% ácido cítrico)	0,79 b	0,93 a	0,94 a	2,0
Ácido Ascórbico (mg 100^{-1} g polpa)	50,6 a	45,1 b	44,0 b	2,1

*Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n = 3).

5 DISCUSSÃO

Foi observado um pico de produção de etileno nos mamões no segundo dia de armazenamento (Figura 5), acompanhado pelo primeiro aumento na respiração, ou seja, no terceiro dia de armazenamento (Figura 6). Esse aumento da respiração parece mesmo ser

consequência do estímulo do metabolismo pelo etileno. Segundo ROMANI (1984), cada célula do fruto é um sistema em equilíbrio dinâmico, onde a imposição de qualquer tipo de estresse ou estímulo gera como resposta compensatória um ajuste, seja ele estrutural ou metabólico. O período após a ocorrência do climatério representa a perda da capacidade homeostática da célula resultando na predominância dos processos senescentes (ROMANI, 1984). A teoria de que a respiração climatérica é uma resposta aos efeitos da ação do etileno torna-se clara nos frutos não climatéricos que, de modo geral durante o amadurecimento, apresentam baixa produção de etileno e diminuição na respiração, sendo esta aumentada quando se aplica etileno exógeno (MATTOO & SUTTLE, 1991).

BIALE et al. (1954) e WATADA et al. (1984) atribuem o aumento da respiração que ocorre no climatério como uma necessidade de aumento da demanda energética para o amadurecimento dos frutos. No entanto, SOLOMOS (1977) demonstrou que a energia gerada pelo metabolismo basal já seria suficiente para as transformações bioquímicas durante o amadurecimento. Segundo BIALE et al. (1954), a respiração dos frutos climatéricos atinge um pico que, com o aumento da produção de etileno, os levam ao amadurecimento e logo depois à senescência e morte. A produção de etileno pelos frutos climatéricos é considerada essencial ao seu amadurecimento e também é um produto desse processo, sendo que a sua produção aumenta durante o amadurecimento do fruto (BIALE et al., 1954).

Nesse estudo, o aumento da respiração no mamão seguiu o aumento da produção de etileno. Esse mesmo comportamento foi encontrado por JACOMINO et al. (2002), também em mamões, onde o aumento na produção de etileno precedeu a ascensão climatérica da respiração, mostrando o efeito indutor do etileno sobre o processo respiratório. NELSON (1939) também observou um comportamento semelhante a esse em bananas. Um comportamento diferente do etileno e da respiração foi encontrado por NELSON (1940) em estudos com maçãs, onde o aumento na produção de etileno seguiu o aumento na respiração. HANSEN (1942), em experimentos com pêras, observou que a máxima produção de etileno coincidiu com a mais alta respiração dos frutos. Um comportamento similar foi observado por PRATT & BIALE (1944) para abacates. Assim, o aumento da produção de etileno durante o climatério respiratório pode iniciar-se antes, ser inseparável desta (BIALE et al., 1954; BIALE & YOUNG, 1982) ou ocorrer após a mudança na respiração nos frutos climatéricos (NELSON, 1940). Esse comportamento promove divergências quanto ao fato de ser ou não o etileno o iniciador do climatério, ou seja, se a sua produção endógena é ou não o sinal para desencadear as mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem no climatério (KNEE, 1995; SALTVEIT, 1993). Portanto, o período climatérico é o período no desenvolvimento dos

frutos que envolve uma série de mudanças bioquímicas associadas com o aumento da respiração e com a produção autocatalítica de etileno (RHODES, 1970; WATADA et al., 1984).

Nos morangos avaliados, a produção de etileno atingiu valor máximo nos primeiros dois dias de armazenamento e depois diminuiu (Figura 7), diferente da respiração, que diminuiu até o terceiro dia de armazenamento, aumentando posteriormente (Figura 8), até o final do período analisado. Segundo ABELES & TAKEDA (1990), KNEE et al. (1977) e WILLS & KIM (1995), os morangos produzem muito pouco etileno (inferior a 0,1 $\mu L\ kg^{-1}\ h^{-1}$ a 20 ºC), não tendo sido observada a produção autocatalítica de etileno em nenhum estádio de amadurecimento. RHODES (1970) mostrou que o amadurecimento do morango é um processo não climatérico e insensível ao etileno. MORDY et al. (2000) sugeriram que a produção de etileno nos morangos parece estar sob o controle de uma resposta negativa ao longo do amadurecimento. Já LANNETTA et al. (2006) mostraram que o padrão de produção do etileno em morangos é semelhante àquele exemplificado para tomate, onde a produção de etileno é auto regulada via processos de resposta negativa até o estádio verde, quando a regulação muda para controle positivo.

Os resultados apresentados por LANNETTA et al. (2006) realçam que o termo climatério pode estar, cientificamente, sob discussão, além de não ser mais aplicado consistentemente para explicar a complexidade biológica do amadurecimento. Esses mesmos autores ainda demonstraram que, pela definição fisiológica, o morango é um fruto climatérico, porque um aumento respiratório ocorre concomitante com um aumento de etileno no amadurecimento desse fruto, o que não foi observado nessa pesquisa. Assim, a classificação original de frutos climatéricos e não climatéricos, baseada no padrão respiratório e na síntese de etileno, gera controvérsias (CARA & GIOVANNONI, 2008).

Em frutos não climatéricos como o morango, a taxa de respiração diminui progressivamente devido à senescência dos tecidos (KAYS, 1991), até que ocorre a invasão microbiana ou por fungos (NICOLAÏ et al., 2005). Portanto, o aumento da respiração do morango após o terceiro dia de armazenamento pode estar relacionado à presença de patógenos, que infectaram os frutos no campo e ainda não manifestaram sintomas. No morango, o problema mais comum é a podridão cinzenta, causada pelo fungo *Botrytis cinerea*, que consegue crescer mesmo a 0 ^{o}C (EL-KAZZAZ et al., 1983).

A magnitude das mudanças que ocorrem na respiração e produção de etileno do morango foi muito menor quando comparada àquelas observadas nos mamões. Talvez se considerarmos a respiração e a produção de etileno como parte do amadurecimento e

levarmos em conta a ocorrência ou não de mudanças significativas nesses dois processos, o termo climatério possa realmente ser aplicado ao total de mudanças que ocorrem durante o amadurecimento.

ROMANI (1984) propôs que o climatério seria a máxima resposta homeostática da mitocôndria para compensar os efeitos degradantes da senescência celular e que o aumento na produção de etileno também seria uma resposta a esse estresse. BRENNAN & FRENKEL (1977) e LESHEM et al. (1986) também demonstraram que, no início do amadurecimento de frutos, o aumento natural de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de outras espécies ativas de oxigênio (EAOs) é acompanhado por um aumento paralelo na concentração de etileno. O aumento natural de EAOs no início do amadurecimento ativa o sistema antioxidante celular. Nesse estudo foi observado aumento de atividade da catalase (CAT) (70,2 μmol min^{-1} mg^{-1} proteína) (Figura 9) e da glutationa redutase (GR) (6,7 μmol min^{-1} mg^{-1} proteína) (Figuras 10 e 11) no terceiro dia de armazenamento na polpa dos mamões. A superóxido dismutase (SOD) (Figura 13) sofreu pouca alteração na sua atividade e a ascorbato peroxidase (APX) (Figura 16) apresentou um aumento linear durante os dias de armazenamento na polpa dos mamões. Também foi notada alta atividade da CAT (111,9 μmol min^{-1} mg^{-1} proteína) (Figura 9), GR (4,7 μmol min^{-1} mg^{-1} proteína) (Figuras 10 e 11) e SOD (Figura 13) nos quatro primeiros dias de armazenamento na casca dos mamões. Essas atividades, tanto na polpa quanto na casca dos mamões, ocorreram após ou coincidiram com o aumento na produção de etileno (Figura 5) e na respiração dos mamões (Figura 6). O aumento de atividades da CAT, GR, SOD e APX, próximo ao pico de etileno e ao aumento da respiração, está relacionado à produção de oxidantes com o início do amadurecimento.

Nos morangos, a avaliação das enzimas antioxidantes não foi satisfatória. Como o morango é um pseudofruto, onde vários aquênios ficam associados a uma parte carnosa correspondente ao receptáculo da flor, o que faz com que seja comestível (AZEVEDO, 2007), talvez as enzimas estudadas possam se expressar diferentemente das enzimas encontradas nos frutos verdadeiros, que são formados pelo desenvolvimento do ovário da flor após a fecundação, ou seja, as diferentes origens embrionárias dos frutos utilizados nessa pesquisa (morango e mamão) podem influenciar as atividades enzimáticas da CAT, SOD, GR e APX.

O início do amadurecimento, sinalizado pelo aumento de etileno, está relacionado às atividades da SOD e da CAT. Em maçã 'Fuji' e 'Golden Delicious', o pico do etileno foi associado com os picos de atividade da SOD e da CAT (MASIA, 1998). Em tomates, as atividades da SOD declinaram constantemente do estádio verde ao estádio vermelho

(RABINOWITCH et al., 1982). MATTOO & MODI (1969) observaram que em mangas, o etileno sintetizado durante o amadurecimento ativou enzimas antioxidantes, como a CAT, e inativou os inibidores dessas enzimas presentes nos frutos não maduros.

A atividade da CAT é fundamental durante o amadurecimento e senescência de frutos pela capacidade de remoção, nos tecidos, do excesso de H_2O_2 que é produzido principalmente pela atividade da SOD (FOYER et al., 1997; MONK et al., 1989). O H_2O_2, capaz de se difundir rapidamente através das membranas celulares, pode atuar como um mensageiro secundário na indução seletiva de genes de defesa (FOYER et al., 1997) ou pode agir causando danos aos tecidos. A regulação dos genes da SOD parece ser muito sensível ao estresse ambiental, presumivelmente como uma consequência da formação aumentada de EAOs (BOWLER et al., 1992).

Em maçãs 'Fuji', as atividades de SOD e CAT apresentaram um pico coincidindo com o aumento de produção de etileno, e depois diminuíram as suas atividades (MASIA, 1998). DU & BRAMLAGE (1994) demonstraram claramente que a atividade total da SOD e as atividades individuais de suas três isoenzimas sofreram mudanças consideráveis durante a senescência de maçãs em armazenamento refrigerado. DHINDSA et al. (1981) observaram que a atividade da SOD decresceu durante a senescência das folhas, mas DU & BRAMLAGE (1994) verificaram que a atividade dessa enzima aumentou durante a senescência de maçã. De acordo com ROGIERS et al. (1998), as atividades da SOD e CAT foram maiores em frutos verdes, mas foram reduzidas de 4 a 18 vezes, respectivamente, nos frutos desenvolvidos e totalmente maduros, entretanto, a atividade da GR aumentou ligeiramente nos frutos totalmente maduros.

Estudos com cotilédones de pepino mostraram que as atividades celulares da SOD, CAT, APX e GR aumentaram durante a senescência induzida pelo estresse. Quando senescentes naturalmente, as atividades da SOD, CAT e GR desses cotilédones diminuíram gradualmente, enquanto APX aumentou sua atividade durante a senescência (KANAZAWA et al., 2000). KLUGE et al. (2006) verificaram que a atividade da APX foi maior em laranjas submetidas ao aquecimento quando comparadas com laranjas não submetidas ao estresse. Nos mamões estudados, a atividade da APX (Figura 16) também aumentou na polpa durante o amadurecimento.

MEHLHORN (1990), estudando ervilhas, verificou que a atividade da APX aumentou após o pré-tratamento das plantas com etileno. Uma possível explicação do porque as plantas estressadas têm taxas aumentadas de produção de etileno tem sido sugerida pela habilidade conhecida do etileno em induzir a atividade da APX (ABELES et al., 1988; RIDGE &

OSBORNE, 1970). Em plantas expostas a estresses, cuja atividade da APX é regulada pelo etileno, a produção desse hormônio ocorre visando fornecer às células maior resistência contra a formação de H_2O_2 (MEHLHORN, 1990).

MALACRIDA et al. (2006), estudando tomates submetidos a estresse por frio durante a pós-colheita, observaram que a atividade da SOD foi similar durante o amadurecimento dos frutos. Nesse mesmo estudo, a atividade da APX e da CAT dos frutos verdes, que foram submetidos ao estresse por frio, foi menor do que a atividade encontrada nos frutos verdes não submetidos ao estresse. Já a atividade da GR foi 2,3 vezes maior nos frutos verdes submetidos ao estresse por frio do que no controle. Esse alto valor de atividade da GR diminuiu durante o amadurecimento subseqüente (MALACRIDA et al., 2006). Nos mamões estudados, a atividade da GR diminuiu cerca de duas vezes do terceiro para o quarto dia e do segundo para o quinto dia de armazenamento na polpa e casca, respectivamente.

As atividades das enzimas CAT, SOD, APX e GR em mangas foram notavelmente aumentadas após serem submetidas às condições de estresse por frio durante o período de armazenamento. Esses aumentos foram significativamente maiores do que as atividades enzimáticas dos frutos não submetidos ao estresse por frio durante o amadurecimento. Já frutos tratados com H_2O_2 apresentaram atividades aumentadas de CAT e SOD e atividades significativamente reduzidas de APX e GR (WANG et al., 2008).

LLISO et al. (2007), estudando as mudanças enzimáticas que ocorrem em citros durante a pós-colheita, demonstraram que os níveis de SOD foram semelhantes para os frutos submetidos aos estresses por frio e por seca e para os frutos não submetidos a esses estresses; entretanto, a atividade da APX apresentou-se fortemente reduzida.

Como a respiração é fonte ativa de EAOs (PURVIS et al., 1995; RICH & BONNER, 1978), o climatério respiratório é, provavelmente, um contribuinte para o aumento do estresse oxidativo durante essa fase do desenvolvimento, iniciando-se a produção de oxidantes celulares (RICH & BONNER, 1978). Assim, o aumento da respiração no terceiro dia de armazenamento (Figura 6), induzido pela produção de etileno no segundo dia de armazenamento nos mamões (Figura 5), leva à formação de radicais livres, indicada pelo aumento da peroxidação lipídica (Figura 17), que ocorre no quarto dia na polpa e no quinto dia de armazenamento na casca. Os radicais livres formados, se não inativados, induzem a peroxidação lipídica (DHINDSA et al., 1982), que inicia as mudanças deteriorativas associadas com o amadurecimento dos frutos (DU & BRAMLAGE, 1994; MEIR et al., 1991). Assim, a produção de EAOs ativa o sistema antioxidante celular, onde a SOD e a CAT

são as enzimas antioxidantes mais eficientes, influenciando os padrões de amadurecimento dos frutos (MASIA, 1998).

O aumento da peroxidação lipídica (Figura 17) foi acompanhado pela diminuição da atividade das enzimas CAT (Figura 9), GR (Figuras 10 e 11) e SOD (Figura 13) no quarto e quinto dias de armazenamento na polpa e na casca dos mamões, respectivamente. ROGIERS et al. (1998) mostraram que o estresse oxidativo aumentou progressivamente durante o amadurecimento, provavelmente como consequência da redução das atividades de enzimas chaves como a SOD e a CAT, responsáveis pela eliminação das EAOs. A atividade da SOD diminuiu durante a senescência em muitos sistemas vegetais, resultando em um aumento do ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$) e, assim, no estresse oxidativo (DHINDSA et al., 1981).

A peroxidação lipídica induz aumento de enzimas antioxidantes como a CAT, responsáveis por remover o excesso de H_2O_2, o que pode ser verificado por novos aumentos das atividades da CAT (Figura 9) no sexto dia de armazenamento, GR (Figuras 10 e 11) e SOD (Figura 13) no quinto dia de armazenamento na polpa, e das atividades da CAT (Figura 9) no sétimo dia de armazenamento, GR (Figuras 10 e 11) e SOD (Figura 13) no sexto dia de armazenamento na casca dos mamões. Apesar dos resultados referentes à peroxidação lipídica nos morangos não serem satisfatórios, observou-se um decréscimo de atividade da GR (Figura 12) e da SOD (Figura 15) no terceiro dia de armazenamento e um novo aumento dessas mesmas enzimas a partir do quarto dia de armazenamento dos frutos.

Mudanças no estresse oxidativo durante o desenvolvimento dos frutos podem ser avaliadas pela extensão da peroxidação lipídica. Os lipídios da membrana e os ácidos graxos livres são altamente susceptíveis à oxidação e o aumento do estresse oxidativo é, então, indicado pelo acúmulo de produtos da peroxidação lipídica. O acúmulo de produtos da peroxidação lipídica é uma prova do aumento do estresse oxidativo durante a fase de amadurecimento do desenvolvimento dos frutos (ROGIERS et al., 1998). Inicialmente, a transformação de lipídios leva à ruptura de membrana. Os radicais livres são depois produzidos por peroxidação (ARORA et al., 2002).

Aumentos nos danos oxidativos mediados por radicais livres e perda de integridade de membrana são características de tecidos de planta em senescência (DHINDSA et al., 1981; THOMPSON, 1984). Como a senescência, o amadurecimento de frutos é acompanhado pela deterioração de membranas celulares (FERRIE et al., 1994; SACHER, 1973).

De acordo com ROGIERS et al. (1998), o aumento do estresse oxidativo que provavelmente resulta de baixas atividades das enzimas antioxidantes é necessário para facilitar as muitas alterações metabólicas associadas com o amadurecimento dos frutos. Uma

vez que todo o processo de amadurecimento do fruto é considerado uma forma funcionalmente modificada de prolongar a senescência, o mecanismo de deterioração da membrana durante o amadurecimento também pode, provavelmente, ser semelhante àquele caracterizado nos sistemas senescentes (MONDAL et al., 2004). Portanto, o amadurecimento e a senescência de frutos podem ser considerados fenômenos oxidativos, especialmente no início da senescência, quando as atividades da SOD e de outras enzimas destoxificantes do oxigênio decrescem, permitindo que $O_2^{-\bullet}$ ou H_2O_2 acumulem-se em níveis tóxicos (BOWLER et al., 1992).

O segundo aumento na respiração (Figura 6), no oitavo dia de armazenamento, parece ser resposta ao estresse oxidativo, evidenciado por um novo aumento na peroxidação lipídica (Figura 17) no sexto e sétimo dias de armazenamento na polpa e casca, respectivamente, na tentativa de se manter a homeostase celular. No entanto, esse novo aumento da respiração também pode estar relacionado à presença de patógenos que ainda não manifestaram sintomas. Apesar de serem utilizados mamões sem sintomas visuais de ataque de patógenos durante o experimento, DICKMAN & ALVAREZ (1983) e DURÁN et al. (1999) observaram que o mamão se desenvolve durante aproximadamente cinco a seis meses no campo, sendo, na maior parte desse tempo, suscetível a *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causador da antracnose e da podridão peduncular no mamão, que pode infectar os frutos fisiologicamente imaturos e permanecer no estado quiescente até o fruto atingir o amadurecimento. Assim, a infecção que ocorreu no campo dificilmente é detectada até a colheita, pois os sintomas da antracnose e da podridão peduncular normalmente surgem durante a pós-colheita dos frutos (NERY-SILVA et al., 2001; TATAGIBA et al., 2002).

No mamão, as maiores alterações nas características físico-químicas (firmeza da polpa, cor da casca e teor de ácido ascórbico) dos frutos foram observadas após o aumento da produção de etileno e da respiração, como observado também para as atividades enzimáticas. Nos morangos, a magnitude dessas mudanças nas características físico-químicas foi menor quando comparada à do mamão e, como este é um pseudofruto, essas mudanças nas características físico-químicas relacionadas ao amadurecimento podem ser diferentes daquelas observadas nos frutos verdadeiros, como o mamão. Nota-se que, embora menos expressivas, durante o período pós-colheita ocorrem mudanças nas características físico-químicas dos morangos, frutos considerados não climatéricos. Essas características físico-químicas avaliadas para mamões e morangos demonstraram que ocorreu acúmulo de antocianinas, quebra de clorofila e amolecimento durante o amadurecimento dos frutos, conforme discutido por ROGIERS & KNOWLES (1997).

Nos mamões 'Golden' estudados, o teor de sólidos solúveis não variou significativamente durante os dias de armazenamento (Tabela 1). FAGUNDES & YAMANISHI (2001) encontraram teores de sólidos solúveis variando de 9,9 a 12,5 ºBrix em mamões do grupo 'Solo', sendo inferiores aos valores médios de 13,3 e 12,0 ºBrix, obtidos por VIEGAS (1992) para as cultivares 'Sunrise-Solo' e grupo 'Formosa', respectivamente. FIORAVANÇO et al. (1996) analisaram frutos do grupo 'Solo' e encontraram valores de sólidos solúveis oscilando entre 8,7 e 11,7 ºBrix. De acordo com ZHOU & PAULL (2001), o teor de açúcares em mamões se mantém constante após a colheita. O mamão acumula pouco amido, até 60 dias após a antese, a quantidade é de aproximadamente 0,5%. Essa quantidade diminui com o desenvolvimento do fruto e se estabiliza em torno de 0,1% após 75 dias de antese. Portanto, o mamão não apresenta quantidade significativa de amido para ser hidrolisado durante o amadurecimento, o que resulta em pouca variação nos teores de sólidos solúveis durante a pós-colheita dos frutos (SELVARAJ et al., 1982).

A acidez titulável dos mamões aumentou durante o amadurecimento (Tabela 1). FAGUNDES & YAMANISHI (2001) encontraram valores entre 0,04 e 0,16% de ácido cítrico. Segundo PAULL et al., (1999), o aumento da acidez na polpa de mamões ao longo do seu amadurecimento pode ser devido aos ácidos galacturônicos liberados durante a hidrólise de componentes da parede celular, como a hidrólise da pectina pela pectinametilesterase, responsáveis pela firmeza dos tecidos. Este incremento da acidez é devido ao aumento da atividade metabólica característica do pico climatérico do mamão, que levaria à síntese de ácidos orgânicos (PAULL & CHEN, 1983). Estes resultados são similares aos encontrados por CÂMARA et al. (1993), que observaram uma elevação da acidez durante o amadurecimento do mamão armazenado à temperatura de 10 °C.

Nos mamões analisados, o teor de ácido ascórbico aumentou acentuadamente durante os dias de armazenamento (Tabela 1). Segundo SELVARAJ et al. (1982), a quantidade de ácido ascórbico nos frutos, 130-140 dias após a antese, é menor quando comparada a frutos mais verdes. No entanto, essa quantidade volta a aumentar quando o fruto começa a amadurecer, sendo que, no fruto maduro, a quantidade de ácido ascórbico é praticamente a mesma comparada com a do fruto com 15 dias após a antese (SELVARAJ et al., 1982). Além disso, alguns estudos propõem que a manose e a L-galactose são intermediários na via de síntese de ácido ascórbico em plantas. Essas substâncias são utilizadas para a biossíntese de carboidratos da parede celular. Assim, a degradação da parede celular durante o amadurecimento provê substratos para a síntese de ácido ascórbico, podendo explicar o fato

dos teores de ácido ascórbico terem aumentado nos mamões 'Golden' (CONKLIN, 2001; WOLUCKA & VAN MONTAGU, 2003).

Para os mamões, o desverdecimento da casca, observado nessa pesquisa através da redução do ângulo de cor (Figura 20), é decorrente da quebra da estrutura da molécula de clorofila, envolvendo a atividade da enzima clorofilase. A elevação da atividade desta enzima está geralmente associada com a produção de etileno durante o amadurecimento do fruto (TUCKER, 1993). De acordo com ZHOU & PAULL (2001), a cor da casca em mamões se altera rapidamente após a colheita.

A firmeza da polpa do fruto é determinada pela força de coesão entre as pectinas (LELIÈVRE et al., 1997). Com a evolução do amadurecimento, ocorre atuação de enzimas pectinolíticas, como o aumento da atividade da pectinametilesterase (LOURENÇO & CATUTANI, 1984), acompanhado por um aumento na atividade da poligalacturonase (LAZAN et al., 1995), que transformam a pectina insolúvel em solúvel e promovem o amolecimento dos frutos, conforme observado nos mamões avaliados, onde a firmeza dos frutos decresceu acentuadamente (Figura 18). O amolecimento dos frutos é um dos processos do amadurecimento mais sensíveis ao etileno (LELIÈVRE et al., 1997). A pectinametilesterase tem efeito no amolecimento da parede celular, servindo para provocar uma desmetilação parcial, que permite a atividade da poligalacturonase (AWAD & YOUNG, 1979). Outra enzima que tem sido associada ao amolecimento da polpa dos mamões é a β-galactosidase, que, provavelmente, completa a ação da poligalacturonase (LAZAN et al., 1989).

Nos morangos, usualmente durante a pós-colheita dos frutos, o teor de sólidos solúveis aumenta no transcorrer do processo de amadurecimento dos frutos, seja por biossíntese ou pela degradação de polissacarídeos (FRANÇOSO et al., 2008), o que não foi observado nesse estudo, onde o teor de sólidos solúveis não variou significativamente durante os dias analisados (Tabela 2). De acordo com AZEVEDO (2007) e CALEGANO et al. (2002), os ácidos orgânicos, medidos através da acidez titulável, tendem a diminuir após a colheita dos frutos, em virtude da sua utilização como substrato respiratório, o que também não foi observado nessa pesquisa com os morangos, onde a acidez titulável aumentou durante os dias de análise (Tabela 2). Com relação ao teor de ácido ascórbico (vitamina C), o morango é uma fruta cítrica com grande teor de vitamina C (ROCHA et al., 2008), ainda que os níveis oscilem conforme a cultivar, o estado de amadurecimento e as condições de cultivo (KIDMOSE et al., 1996) e, na literatura, são apresentados dados relativos de vitamina C variando de 39 a 89 mg 100^{-1} g de polpa (DOMINGOS, 2000), como foi observado nessa

pesquisa (Tabela 2). O ácido ascórbico é uma das vitaminas mais instáveis, pelo que um adequado manuseio pós-colheita é fundamental para evitar a redução dos seus níveis (NUNES et al., 1995), redução essa que foi observada nos morangos desse estudo (Tabela 2). Além disso, o decréscimo no teor de ácido ascórbico é atribuído à maior atuação da enzima ácido ascórbico oxidase (ascorbato oxidase) (NOGUEIRA et al., 2002).

Com relação à coloração dos morangos, a cor vermelha característica é desenvolvida através da síntese de antocianinas (GIVEN et al., 1988), compostos antioxidantes instáveis presentes em níveis elevados nesses frutos (AABY et al., 2005), que podem sofrer alterações de cor ou degradação dependendo das condições de exposição do produto, como sejam a temperatura (HOLKROFT & KADER, 1999), o pH e a concentração de O_2 e/ou CO_2 (GIL et al., 1997). A presença de enzimas e a perda de água também podem afetar o perfil das antocianinas (KALT et al., 1993). HOLKROFT & KADER (1999) consideram que a via biossintética das antocianinas se mantém operativa mesmo a baixas temperaturas, fomentando um aumento contínuo de antocianinas durante o período de armazenamento dos frutos (GIL et al., 1997; KALT et al., 1993), como observado nesse estudo (Figuras 22 e 23). Os ácidos orgânicos presentes nos morangos possuem importância a nível da regulação do pH vacuolar, influenciando a estabilidade das antocianinas e, possuindo consequentemente, um papel relevante na cor dos frutos (AZEVEDO, 2007).

Durante o amadurecimento, ocorre uma série de alterações nos frutos, sendo uma delas o amolecimento, relacionado com o metabolismo da parede celular (CIVELLO et al., 1999), com um aumento da ação de diversas enzimas específicas como a celulase (TRAINOTTI et al., 1999), a xilosidase (MARTÍNEZ et al., 2004), a galactosidase (TRAINOTTI et al., 2001), as expansinas (DOTTO et al., 2006) e a pectato-liase (BENÍTEZ-BURRACO et al., 2003). A redução da firmeza dos morangos ao longo do tempo de análise desse estudo (Figura 19) parece sugerir um amolecimento dos frutos. AZEVEDO (2007) verificou que, apesar dos diferentes valores iniciais, no final do período de armazenamento, todas as cultivares de morango estudadas apresentavam uma redução da firmeza.

Eventos bioquímicos semelhantes frequentemente ocorrem durante o amadurecimento de frutos climatéricos e não climatéricos incluindo mudança na coloração, metabolismo alterado de amido/açúcar, amolecimento, modificação na textura, síntese de voláteis aromáticos e aumento da susceptibilidade a patógenos (CARA & GIOVANNONI, 2008). Além disso, genes comuns regulando o amadurecimento em ambos os tipos de frutos ainda mostram expressão alterada, suportando a hipótese que os caminhos de regulação dos genes dependentes e independentes do etileno coordenam o processo de amadurecimento dos frutos

com reguladores primários possivelmente conservados através da evolução (ADAMS-PHILLIPS et al., 2004; LELIÈVRE et al., 1997).

Se analisarmos a totalidade das mudanças fisiológicas e físico-químicas durante a pós-colheita e não necessariamente a presença de picos na produção de etileno e na respiração como uma necessidade para o amadurecimento, poderemos propor uma melhor definição para frutos climatéricos e não climatéricos. O amadurecimento pode ser visto como um fenômeno oxidativo que envolve peroxidação lipídica pelos radicais livres e alterações nos níveis de antioxidantes. Ao mesmo tempo em que observamos essas alterações, ainda acontecem mudanças na qualidade dos frutos que hoje são chamadas de amadurecimento. Portanto, o processo do amadurecimento pode sim ser considerado parte da senescência, como é hoje definida.

6 CONCLUSÕES

No início do amadurecimento de mamões, sugere-se que o etileno se mostra como gatilho para as alterações no fruto e não como uma resposta a um possível estresse oxidativo.

O climatério respiratório é consequência do aumento do metabolismo celular, mas, como ele próprio é fonte de espécies ativas de oxigênio, sugere-se que ele contribua para a ocorrência do estresse oxidativo, evidenciado por alterações na catalase, glutationa redutase, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e peroxidação lipídica.

Os morangos apresentaram alterações nas atividades da glutationa redutase e da superóxido dismutase, além de mostrarem mudanças nas características físico-químicas, na respiração e na produção de etileno. Contudo, os resultados foram inconclusivos para relacionar a atividade das enzimas antioxidantes com o padrão de amadurecimento do morango.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AABY, K.; SKREDE, G.; WROLSTAD, R.E. Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington, v. 53, n. 10, p. 4032-4040, 2005.

ABELES, F.B.; DUNN, L.J.; CALLAHAN, A.; DINTERMAN, R.E.; SCHMIDT, J. Induction of a 33-kD peroxidases during ethylene-induced senescence of cucumber cotyledons. **Plant Physiology,** Waterbury, v. 87, n. 3, p. 609-615, 1988.

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

ABELES, F.B.; TAKEDA, F. Cellulase activity and ethylene in ripening strawberry and apple fruits. **Scientia Horticulturae,** v. 42, n. 4, p. 269-275, 1990.

ADAMS, D.O.; YANG, S.F. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 76, n. 1, p. 170-174, 1979.

ADAMS-PHILLIPS, L.; BARRY, C.; GIOVANNONI, J. Signal transduction systems regulating fruit ripening. **Trends in Plant Science,** Oxford, v. 9, n. 7, p. 331-338, 2004.

ALLEN, R.D. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 107, n. 4, p. 1049-1054, 1995.

ALSCHER, R.G.; DONAHUE, J.L.; CRAMER, C.L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 100, n. 2, p. 224-233, 1997.

ALSCHER, R.G.; DONAHUE, J.L.; CRAMER, C.L. Molecular responses to reactive oxygen species: multifaceted changes in gene expression. In: DE KOK, L.J.; STULEN, I. (Eds.). **Responses of plant metabolism to air pollution and global change**. Leiden: Backhuys Publishers, 1998. p. 233-240.

ARORA, A.; SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C. Oxidative stress and antioxidant system in plants. **Current Science**, Bangalore, v. 82, n. 10, p. 1227-1238, 2002.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum,** Sweden, v. 85, n. 2, p. 235-241, 1992.

ASADA, K. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London,** London, v. 355, n. 1402, p. 1419-1431, 2000.

ASADA, K.; BADGER, M.R. Photoreduction of $^{18}O_2$ and $H_2{}^{18}O_2$ with concomitant evolution of $^{18}O_2$ in intact spinach chloroplasts: evidence for scavenging of hydrogen peroxide by peroxidase. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 25, n. 7, p. 1169-1179, 1984.

ASADA, K.; TAKAHASHI, M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: KYLE, D.J.; OSMOND, C.B.; ARNTZEN, C.J. (Eds.). **Topics in photosynthesis**. v. 9. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 227-287.

AWAD, M.; YOUNG, R.E. Postharvest variation in cellulose, polygalacturonase and pectin methylesterase in 'Avocado' (*Persea americana* Mill cv. Fuerte) fruit in relation to respiration and ethylene production. **Plant Physiology,** Waterbury, v. 64, n. 2, p. 306-308, 1979.

AZEVEDO, I.G.; OLIVEIRA, J.G.; SILVA, M.G. da; PEREIRA, T.; CORRÊA, S.F.; VARGAS, H.; FAÇANHA, A.R. P-type H^+-ATPases activity, membrane integrity, and apoplastic pH during papaya fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology,** v. 48, n. 2, p. 242-247, 2008.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 104, n. 2, p. 280-292, 1998.

AZEVEDO, S.M. da C. Estudo de taxas de respiração e de fatores de qualidade na conservação de morango fresco (*Fragaria x ananassa* Duch.). 2007. 225f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Consumo Alimentar) – Universidade Aberta do Brasil.

BABIOR, B.M. Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 2, p. 141-155, 1997.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies ativas e defesa do organismo. **Química Nova,** São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARRY, C.S.; LLOP-TOUS, M.I.; GRIERSON, D. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. **Plant Physiology,** Waterbury, v. 123, n. 3, p. 979-986, 2000.

BATTISTONI, A. Role of prokaryotic Cu/Zn-superoxide dismutase in pathogenesis. **Biochemical Society Transactions,** London, v. 31, p. 1326-1329, 2003.

BAUM, J.A.; SCANDALIOS, J.G. Isolation and characterization of the cytosolic and mitochondrial superoxide dismutases of maize. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 206, n. 2, p. 249-264, 1981.

BENÍTEZ-BURRACO, A.; BLANCO-PORTALES, R.; REDONDO-NEVADO, J.; BELLIDO, M.L.; MOYANO, E.; CABALLERO, J.L.; MUÑOZ-BLANCO, J. Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 54, n. 383, p. 633-645, 2003.

BIALE, J.B.; YOUNG, R.E. Respiration and ripening in fruits – retrospect and prospect. In: FRIENDS, J.; RHODES, M.J.C. (Eds.). **Recent advances in the biochemistry of fruit and vegetables.** London: Academic Press, 1982. p. 1-39.

BIALE, J.B.; YOUNG, R.E.; OLMSTEAD, A.J. Fruit respiration and ethylene production. **Plant Physiology,** Waterbury, v. 29, n. 2, p. 168-174, 1954.

BOWER, J.H.; BIASI, W.V.; MITCHAM, E.J. Effects of ethylene and 1-MCP on the quality and storage life of strawberries. **Postharvest Biology and Technology,** v. 28, n. 3, p. 417-423, 2003.

BOWLER, C.; VAN CAMP, W.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia**,** v. 13, n. 3, p. 199-218, 1994.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 83-116, 1992.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRADY, C.J.; SPEIRS, J. Ethylene in fruit ontogeny and abscission. In: MATTOO, A.K.; SUTTLE, J.C. (Eds.). **The plant hormone ethylene.** Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 235-258.

BRENNAN, T.; FRENKEL, C. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 59, n. 3, p. 411-416, 1977.

BUCHANAN-WOLLASTON, V. The molecular biology of leaf senescence. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 48, n. 2, p. 181-199, 1997.

BUENO, P.; VARELA, J.; GIMÉNEZ-GALLEGO, G.; DEL RÍO, L.A. Peroxisomal copper, zinc superoxide dismutase: characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledons. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 108, n. 3, p. 1151-1160, 1995.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology,** Barcelona, v. 3, n. 1, p. 3-8, 2000.

CALEGANO, J.M.; PEZZI, E.; BENDER, R.J. Utilização de atmosfera modificada na conservação de morangos em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v. 37, n. 8, p. 1049-1055, 2002.

CÂMARA, M.M.; DÍEZ, C.; TORIJA, M.E. Changes during ripening of papaya fruit in different storage systems. **Food Chemistry**, Barking, v. 46, n. 1, p. 81-84, 1993.

CARA, B.; GIOVANNONI, J.J. Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. **Plant Science,** Limerick, v. 175, n. 1-2, p. 106-113, 2008.

CARVALHO, C.R.L.; MANTOVANI, D.M.B.; CARVALHO, P.R.N.; MORAES, R.M.M. **Análises químicas de alimentos.** Campinas: ITAL, 1990. 121p.

CASANO, L.M.; LASCANO, H.R.; TRIPPI, V.S. Hydroxyl radicals and a thylakoid-bound endopeptidase are envolved in light and oxygen-induced proteolysis in oat chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 35, n. 2, p. 145-152, 1994.

CHARLES, S.A.; HALLIWELL, B. Light activation of fructose bisphosphatase in isolated spinach chloroplasts and deactivation by hydrogen peroxide. **Planta**, Berlin, v. 151, n. 3, p. 242-246, 1981.

CHEN, Y.T.; CHEN, L.F.O.; SHAW, J.F. Senescence-associated genes in harvested broccoli florets. **Plant Science,** Limerick, v. 175, n. 1-2, p. 137-144, 2008.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças:** fisiologia e manuseio. Escola Superior de Agricultura de Lavras: Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão, 1990. 543p.

CIVELLO, P.M.; POWELL, A.L.T.; SABEHAT, A.; BENNETT, A.B. An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. **Plant Physiology,** Waterbury, v. 121, n. 4, p. 1273-1279, 1999.

CONKLIN, P.L. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. **Plant, Cell and Environment,** Oxford, v. 24, n. 4, p. 383-394, 2001.

DEL RÍO, L.A.; CORPAS, F.J.; SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; GÓMEZ, M.; BARROSO, J.B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 53, n. 372, p. 1255-1272, 2002.

DEL RÍO, L.A.; PASTORI, G.M.; PALMA, J.M.; SANDALIO, L.M.; SEVILLA, F.; CORPAS, F.J.; JIMÉNEZ, A.; LÓPEZ-HUERTAS, E.; HERNÁNDEZ, J.A. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 116, n. 4, p. 1195-1200, 1998.

DELITE, F.S. Resposta antioxidativa de aguapé sob estresse por cádmio. 2007. 101f. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ, Piracicaba.

DHINDSA, R.S.; PLUMB-DHINDSA, P.; REID, D.M. Leaf senescence and lipid peroxidation: effects of some phytohormones, and scavengers of free radicals and singlet oxygen. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 56, n. 4, p. 453-457, 1982.

DHINDSA, R.S.; PLUMB-DHINDSA, P.; THORPE, T.A. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 93-101, 1981.

DICKMAN, M.B.; ALVAREZ, A.M. Latent infection of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Disease,** v. 67, n. 8, p. 748-750, 1983.

DOMINGOS, D.M. Efeito da radiação gama e embalagem na conservação de morangos 'Toyonoka' armazenados sob refrigeração. 2000. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ, Piracicaba.

DOTTO, M.; MARTÍNEZ, G.; CIVELLO, P. Expression of expandin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness. **Plant Physiology and Biochemistry,** v. 44, n. 5-6, p. 301-307, 2006.

DU, Z.; BRAMLAGE, W.J. Superoxide dismutase activities in senescing apple fruits (*Malus domestica* Borkh.). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, n. 3, p. 581-584, 1994.

DU, Z.; BRAMLAGE, W.J. Peroxidative activity of apple peel in relation to development of poststorage disorders. **HortScience**, Palo Alto, v. 30, n. 2, p. 205-209, 1995.

DURÁN, A.; MORA, D.; CHAVARRÍA, E. Determinación de la edad susceptible del fruto de la papaya (*Carica papaya* L.) a la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.). **Agronomía Mesoamericana,** Alajuela, v. 10, n. 1, p. 1-6, 1999.

EL-KAZZAZ, M.K.; SOMMER, N.F.; FORTLAGE, R.J. Effect of different atmospheres on postharvest decay and quality of fresh strawberries. **Phytopatology,** v. 73, n. 2, p. 282-287, 1983.

FAGUNDES, G.R.; YAMANISHI, O.K. Características físicas e químicas de frutos de mamoeiro do grupo 'Solo' comercializados em 4 estabelecimentos de Brasília-DF. **Revista Brasileira de Fruticultura,** Cruz das Almas, v. 23, n. 3, p. 541-545, 2001.

FERRIE, B.J.; BEAUDOIN, N.; BURKHART, W.; BOWSHER, C.G.; ROTHSTEIN, S.J. The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. **Plant Physiology,** Waterbury, v. 106, n. 1, p. 109-118, 1994.

FIORAVANÇO, J.C.; PAIVA, M.C.; CARVALHO, R.I.N. de.; MANICA, I. Qualidade do mamão 'Solo' comercializado em Porto Alegre de outubro/91 a junho/92. **Ciência Agronômica,** Fortaleza, v. 27, n. 1-2, p. 67-71, 1996.

FLORES, F.; BEN AMOR, M.; JONES, B.; PECH, J.C.; BOUZAYEN, M.; LATCHÉ, A.; ROMOJARO, F. The use of ethylene-suppressed lines to assess differential sensitivity to ethylene of the various ripening pathways in Cantaloupe melons. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 113, n. 1, p. 128-133, 2001.

FOYER, C.H. Ascorbic acid. In: ALSCHER, R.G.; HESS, J.L. (Eds.). **Antioxidants in higher plants.** Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 31-58.

FOYER, C.H.; HALLIWELL, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta**, Berlin, v. 133, n. 1, p. 21-25, 1976.

FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 92, n. 4, p. 696-717, 1994.

FOYER, C.H.; LOPEZ-DELGADO, H.; DAT, J.F.; SCOTT, I.M. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 100, n. 2, p. 241-254, 1997.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum,** Sweden, v. 119, n. 3, p. 355-364, 2003.

FRANÇOSO, I.L.T.; COUTO, M.A.L.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; ARTHUR, V. Alterações físico-químicas em morangos (*Fragaria ananassa* Duch.) irradiados e armazenados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v. 28, n. 3, p. 614-619, 2008.

FUCHS, Y.; PESIS, E.; ZAUBERMAN, G. Changes in amylase activity, starch and sugar contents in mango fruit pulp. **Scientia Horticulturae,** v. 13, n. 2, p. 155-160, 1980.

GEORGIEVA, N.V. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems – a review. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine,** Stara Zagora, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2005.

GIL, M.I.; HOLCROFT, D.M.; KADER, A.A. Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington, v. 45, n. 5, p. 1662-1667, 1997.

GIVEN, N.K.; VENIS, M.A.; GRIERSON, D. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis in ripening strawberry fruit. **Journal of Plant Physiology,** Jena, v. 133, p. 25-30, 1988.

GOMES-JUNIOR, R.A.; MOLDES, C.; DELITE, F.S.; POMPEU, G.B.; GRATÃO, P.L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 8, p. 1330-1337, 2006.

GRATÃO, P.L., POLLE, A., LEA, P.J., AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology,** Collingwood, v. 32, n. 6, p. 481-494, 2005.

HACKETT, R.M.; HO, C.W.; LIN, Z.; FOOTE, H.C.; FRAY, R.G.; GRIERSON, D. Antisense inhibition of the *Nr* genes restores normal ripening to the tomato never-ripe mutant, consistent with the ethylene receptor-inhibition model. **Plant Physiology,** Waterbury, v. 124, n. 3, p. 1079-1086, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine.** 3.ed. New York: Oxford University Press, 2001. 936p.

HANSEN, E. Quantitative study of ethylene production in relation to respiration of pears. **Botanical Gazette,** Chicago, v. 103, p. 543-558, 1942.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods:** a guide to modern techniques of plant analysis. 3.ed. London: Chapman and Hall, 1998. 295p.

HODGES, D.M.; DELONG, J.M.; FORNEY, C.F.; PRANGE, R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta,** Berlin, v. 207, n. 4, p. 604-611, 1999.

HOLKROFT, D.M.; KADER, A.A. Carbon dioxide-induced changes in color and anthocyanin synthesis of stored strawberry fruit. **Hortscience,** Palo Alto, v. 34, n. 7, p. 1244-1248, 1999.

HULME, A.C.; RHODES, M.J.C. Pome fruits. In: HULME, A.C. (Ed.). **The biochemistry of fruits and their products.** London: Academic Press, 1971. p. 333-373.

IGAMBERDIEV, A.U.; LEA, P.J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organism. **Phytochemistry,** New York, v. 60, n. 7, p. 651-674, 2002.

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

JIMÉNEZ, A.; HERNÁNDEZ, J.A.; DEL RÍO, L.A.; SEVILLA, F. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiology,** Waterbury, v. 114, n. 1, p. 275-284, 1997.

KALT, W.; PRANGE, R.K.; LIDSTER, P.D. Postharvest color development of strawberries: influence of maturity, temperature and light. **Canadian Journal of Plant Science,** Ottawa, v. 73, n. 2, p. 541-548, 1993.

KANAZAWA, S.; SANO, S.; KOSHIBA, T.; USHIMARU, T. Changes in antioxidative enzymes in cucumber cotyledons during natural senescence: comparison with those during dark-induced senescence. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 109, n. 2, p. 211-216, 2000.

KATZ, E.; LAGUNES, P.M.; RIOV, J.; WEISS, D.; GOLDSCHMIDT, E.E. Molecular and physiological evidence suggests the existence of a system II-like pathway of ethylene production in non-climacteric *Citrus* fruit. **Planta,** Berlin, v. 219, n. 2, p. 243-252, 2004.

KAYS, S.J. **Postharvest physiology of perishable plant products.** New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 532p.

KEITH, K.E.; VALVANO, M.A. Characterization of SodC, a periplasmic superoxide dismutase from *Burkholderia cenocepacia*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, n. 5, p. 2451-2460, 2007.

KIDMOSE, U.; ANDERSEN. H.E.; VANGPETERSEN, O. Yield and quality attributes of strawberry cultivars grown in Denmark 1990-1991. **Fruit Varieties Journal,** Williamsburg, v. 50, n. 3, p. 160-166, 1996.

KLUGE, R.A.; AZEVEDO, R.A.; JOMORI, M.L.L.; EDAGI, F.K.; JACOMINO, A.P.; GAZIOLA, S.A.; DEL AGUILA, J.S. Efeitos de tratamentos térmicos aplicados sobre frutas

cítricas armazenadas sob refrigeração. **Ciência Rural,** Santa Maria, v. 36, n. 5, p. 1388-1396, 2006.

KNEE, M. Do tomatoes on the plant behave as climacteric fruits? **Physiologia Plantarum,** Sweden, v. 95, n. 2, p. 211-216, 1995.

KNEE, M.; SARGENT, J.A.; OSBORNE, D.J. Cell wall metabolism in developing strawberry fruits. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 28, n. 2, p. 377-396, 1977.

KRAUS, T.E.; McKERSIE, B.D.; FLETCHER, R.A. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 145, n. 4, p. 570-576, 1995.

KUNTZ, M.; CHEN, H.C.; SIMKIN, A.J.; RÖMER, S.; SHIPTON, C.A.; DRAKE, R.; SCHUCH, W.; BRAMLEY, P.M. Upregulation of two ripening-related genes from a non-climacteric plant (pepper) in a transgenic climacteric plant (tomato). **The Plant Journal,** London, v. 13, n. 3, p. 351-361, 1998.

LANCAN, D.; BACCOU, J.C. High levels of antioxidant enzymes correlate with delayed senescence in nonnetted muskmelon fruits. **Planta,** Berlin, v. 204, n. 3, p. 377-382, 1998.

LANNETTA, P.P.M.; LAARHOVEN, L.J.; MEDINA-ESCOBAR, N.; JAMES, E.K.; McMANUS, M.T.; DAVIES, H.V.; HARREN, F.J.M. Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. **Physiologia Plantarum,** Sweden, v. 127, n. 2, p. 247-259, 2006.

LAZAN, H.; ALI, Z.M.; LIANG, K.M.; YEE, K.L. Polygalacturonase activity and variation in ripening of papaya fruit tissue depth and heat treatment. **Physiologia Plantarum,** Sweden, v. 77, n. 1, p. 93-98, 1989.

LAZAN, H.; SELAMAT, M.S.; ALI, Z.M. β-galactosidase, polygalacturonase and pectinesterase in differential softening and cell wall modification during papaya fruit ripening. **Physiologia Plantarum,** Sweden, v. 95, n. 1, p. 106-112, 1995.

LEE, D.H.; LEE, C.B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber in gel enzyme activity assays. **Plant Science**, Limerick, v. 159, n. 1, p. 75-85, 2000.

LELIÈVRE, J.M.; LATCHÉ, A.; JONES, B.; BOUZAYEN, M.; PECH, J.C. Ethylene and fruit ripening. **Physiologia Plantarum,** Sweden, v. 101, n. 4, p. 727-739, 1997.

LESHEM, Y.Y.; HALEVY, A.H.; FRENKEL, C.; FRIMER, A.A. Oxidative processes in biological systems and their role in plant senescence. In: LESHEM, Y.Y.; HALEVY, A.H.; FRENKEL, C. (Eds.). **Processes and control of plant senescence (developments in crop science)**. v. 8. Amsterdam: Elsevier, 1986. p. 84-99.

LESTER, G.; STEIN, E. Plasma membrane physicochemical changes during maturation and postharvest storage of muskmelon fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Palo Alto, v. 118, p. 223-227, 1993.

LIZADA, C. Mango. In: SEYMOUR, G.B.; TAYLOR, J.E.; TUCKER, G.A. (Eds.). **Biochemistry of fruit ripening.** London: Chapman and Hall, 1993. p. 255-271.

LLEDIAS, F.; RANGEL, P.; HANSBERG, W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 17, p. 10630-10637, 1998.

LLISO, I.; TADEO, F.R.; PHINNEY, B.S.; WILKERSON, C.G.; TALÓN, M. Protein changes in the albedo of citrus fruits on postharvesting storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington, v. 55, n. 22, p. 9047-9053, 2007.

LOURENÇO, E.J.; CATUTANI, A.T. Purification and properties of pectinesterase from papaya. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** Oxford, v. 35, n. 10, p. 1120-1127, 1984.

LURIE, S.; BEN-ARIE, R. Microsomal membrane changes during the ripening of apple fruit. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 73, n. 3, p. 636-638, 1983.

MALACRIDA, C.; VALLE, E.M.; BOGGIO, S.B. Postharvest chilling induces oxidative stress response in the dwarf tomato cultivar Micro-Tom. **Physiologia Plantarum,** Sweden, v. 127, n. 1, p. 10-18, 2006.

MALLICK, N.; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 157, n. 2, p. 183-193, 2000.

MARTÍNEZ, G.; CHAVES, A.; CIVELLO, P. β-xylosidase activity and expression of a β-xylosidase gene during strawberry fruit ripening. **Plant Physiology and Biochemistry,** v. 42, n. 2, p. 89-96, 2004.

MASIA, A. Superoxide dismutase and catalase activities in apple fruit during ripening and post-harvest and with special reference to ethylene. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 104, n. 4, p. 668-672, 1998.

MASIA, A.; VENTURA, M.; GEMMA, H.; SANSAVINI, S. Effect of some plant growth regulator treatments on apple fruit ripening. **Plant Growth Regulation,** v. 25, n. 2, p. 127-134, 1998.

MATÉS, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, Amsterdam, v. 153, n. 1-3, p. 83-104, 2000.

MATTOO, A.K.; MODI, V.V. Ethylene and ripening of mangoes. **Plant Physiology,** Waterbury, v. 44, n. 2, p. 308-310, 1969.

MATTOO, A.K.; SUTTLE, J.C. **The plant hormone ethylene.** Florida: CRC Press, 1991. 337p.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry,** Baltimore, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

McMURCHIE, E.J.; McGLASSON, W.B.; EAKS, I.L. Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. **Nature,** London, v. 237, p. 235-236, 1972.

MEDLICOTT, A.P.; SIGRIST, J.M.M.; REYNOLDS, S.B.; THOMPSON, A.K. Effects of ethylene and acetylene on mango fruit ripening. **Annals of Applied Biology,** London, v. 111, n. 2, p. 439-444, 1987.

MEHLHORN, H. Ethylene-promoted ascorbate peroxidase activity protects plants against hydrogen peroxide, ozone and paraquat. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 13, n. 9, p. 971-976, 1990.

MEHLHORN, H.; LELANDAIS, M.; KORTH, H.G.; FOYER, C.H. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 378, n. 3, p. 203-206, 1996.

MEIR, S.; PHILOSOPH-HADAS, S.; ZAUBERMAN, G.; FUCHS, Y.; AKERMAN, M.; AHARONI, N. Increased formation of fluorescent lipid-peroxidation products in avocado peels precedes other signs of ripening. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Palo Alto, v. 116, p. 823-826, 1991.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M.; FUKUZAWA K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl_4 intoxication, and vitamin E deficiency. **Biochemical Medicine**, New York, v. 23, n. 3, p. 302–311, 1980.

MILLAR, A.H.; MITTOVA, V.; KIDDLE, G.; HEAZLEWOOD, J.L.; BARTOLI, C.G.; THEODOULOU, F.L.; FOYER, C.H. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implication for stress responses. **Plant Physiology,** Waterbury, v. 133, n. 2, p. 443-447, 2003.

MOLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,** Palo Alto, v. 52, p. 561-591, 2001.

MONDAL, K.; SHARMA, N.S.; MALHOTRA, S.P.; DHAWAN, K.; SINGH, R. Antioxidant systems in ripening tomato fruits. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 48, n. 1, p. 49-53, 2004.

MONK, L.S.; FAGERSTEDT, K.V.; CRAWFORD, M.M. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 76, n. 3, p. 456-459, 1989.

MORDY, A.A.A.; BRECHT, J.K.; HUBER, D.J. Ethylene feedback mechanisms in tomato and strawberry fruit tissues in relation to fruit ripening and climacteric patterns. **Postharvest Biology and Technology,** v. 20, n. 2, p. 151-162, 2000.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NELSON, R.C. Production and consumption of ethylene by ethylene-treated bananas. **Plant Physiology,** Waterbury, v. 14, n. 4, p. 817-822, 1939.

NELSON, R.C. Quantitative study of the production of ethylene by ripening McIntosh apples. **Plant Physiology,** Waterbury, v. 15, n. 1, p. 149-151, 1940.

NERY-SILVA, F.A.; MACHADO, J. da C.; LIMA, L.C. de O.; RESENDE, M.L.V. de. Controle químico da podridão peduncular de mamão causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. **Ciência e Agrotecnologia,** Lavras, v. 25, n. 3, p. 519-524, 2001.

NICOLAÏ, B.; LAMMERTYN, J.; SCHOTSMANS, W.; VERLINDEN, B. Gas exchange properties of fruit and vegetables. In: RAO, M.A; RIVZI, S.S.H.; DATTA, A.K. (Eds.). **Engineering Properties of Foods.** 3.ed. Boca Raton: CRC Press, 2005. 768p.

NOCTOR, G.; DUTILLEUL, C.; PAEPE, R. de; FOYER, C.H. Use of mitochondrial electron transport mutants to evaluate the effects of redox state on photosynthesis, stress tolerance and the integration of carbon/nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 55, n. 394, p. 49-57, 2004.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. A re-evaluation of the ATP:NADPH budget during C_3 photosynthesis: a contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity?. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 329, p. 1895-1908, 1998.

NOCTOR, G.; GOMEZ, L.; VANACKER, H.; FOYER, C.H. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 53, n. 372, p. 1283-1304, 2002.

NOGUEIRA, R.J.M.C.; MORAES, J.A.P.V.; BURITY, H.A.; SILVA, J.F.Jr. Efeito do estádio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v. 37, n. 4, p. 463-470, 2002.

NOODÉN, L.D. The phenomena of senescence and aging. In: NOODÉN, L.D.; LEOPOLD, A.C. (Eds.). **Senescence and aging in plants.** San Diego: Academic Press, 1988. p. 1-50.

NUNES, M.C.N.; BRECHT, J.K.; MORAIS, A.M.M.B.; SARGENT, S.A. Physical and chemical quality characteristics of strawberries after storage are reduced by a short delay to cooling. **Postharvest Biology and Technology,** v. 6, n. 1, p. 17-28, 1995.

OETIKER, J.H.; YANG, S.F. The role of ethylene in fruit ripening. **Acta Horticulturae,** Wellington, v. 398, p. 167-178, 1995.

OGAWA, K.; KANEMATSU, S.; TAKABE, K.; ASADA, K. Attachment of CuZn-superoxide dismutase to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplasts: detection by immuno-gold labeling after rapid freezing and substitution method. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 36, n. 4, p. 565-573, 1995.

OKAMOTO, O.K.; PINTO, E.; LATORRE, L.R.; BECHARA, E.J.H.; COLEPICOLO, P. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 40, n. 1, p. 18-24, 2001.

PAGE, T.; GRIFFITHS, G.; BUCHANAN-WOLLASTON, V. Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. **Plant Physiology,** Waterbury, v. 125, n. 2, p. 718-727, 2001.

PALMA, T.; MARANGONI, A.G.; STANLEY, D.W. Environmental stresses affect tomato microsomal membrane function differently than natural ripening and senescence. **Postharvest Biology and Technology**, v. 6, n. 3-4, p. 257-273, 1995.

PASTORI, G.M.; DEL RÍO, L.A. Natural senescente of pea leaves: an activated oxygen-mediated function for peroxisomes. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 113, n. 2, p. 411-418, 1997.

PAULL, R.E.; CHEN, N.J. Postharvest variation in cell wall-degradin enzymes of papaya (*Carica papaya L.*) during fruit ripening. **Plant physiology**, Waterbury, v. 72, n. 2, p. 382-385, 1983.

PAULL, R.E.; GROSS, K.; QIU, Y. Changes in papaya cell walls during fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 16, n. 1, p. 79-89, 1999.

PECH, J.C.; BOUZAYEN, M.; LATCHÉ, A. Climacteric fruit ripening: ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. **Plant Science,** Limerick, v. 175, n. 1-2, p. 114-120, 2008.

PIGNOCCHI, C.; FOYER, C.H. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signaling. **Current Opinion in Plant Biology,** London, v. 6, n. 4, p. 379-389, 2003.

PRATT, H.K.; BIALE, J.B. Relation of an active emanation to respiration in the avocado fruit. **Plant Physiology,** Waterbury, v. 19, n. 3, p. 519-528, 1944.

PURVIS, A.C.; SHEWFELT, R.L.; GEGOGEINE, J.W. Superoxide production by mitochondria isolated from green bell pepper fruit. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 94, n. 4, p. 743-749, 1995.

RABINOWITCH, H.D.; SKLAN, D.; BUDOWSKI, P. Photo-oxidative damage in the ripening tomato fruit: protective role of superoxide dismutase. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 54, n. 3, p. 369-374, 1982.

RHODES, M.J.C. The climacteric and ripening of fruits. In: HULME, A.C. (Ed.). **The biochemistry of fruits and their products**. v.1. London: Academic Press, 1970. p. 521-536.

RHODES, M.J.C. The maturation and ripening of fruits. In: THIMANN, K.V.; DELMAN, R.C.; ROTH, G.S. (Eds.). **Senescence in plants.** Boca Raton: CRC Press, 1980. p. 157-205.

RHODES, M.J.C.; WOOLTORTON, L.S.C.; GALLIARD, T.; HULME, A.C. The production of ethylene by whole apple fruits and by tissue slices and cell-free extracts prepared from the fruit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 21, n. 66, p. 40-48, 1970.

RICH, P.R.; BONNER, W.D.Jr. The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 188, n. 1, p. 206-213, 1978.

RIDGE, I.; OSBORNE, D.J. Regulation of peroxidase activity by ethylene in *Pisum sativum*: requirements for protein and mRNA synthesis. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 21, n. 3, p. 720-734, 1970.

ROCHA, D.A.; ABREU, C.M.P. de; CORRÊA, A.D.; SANTOS, C.D. dos; FONSECA, E.W.N. da. Análise comparativa de nutrientes funcionais em morangos de diferentes cultivares da região de Lavras-MG. **Revista Brasileira de Fruticultura,** Cruz das Almas, v. 30, n. 4, p. 1124-1128, 2008.

ROGIERS, S.Y.; KNOWLES, N.R. Physical and chemical changes during growth, maturation and ripening of Saskatoon (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) fruit. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 75, n. 8, p. 1215-1225, 1997.

ROGIERS, S.Y.; KUMAR, G.N.M.; KNOWLES, N.R. Maturation and ripening of fruit of *Amelanchier alnifolia* Nutt. are accompanied by increasing oxidative stress. **Annals of Botany,** Oxford, v. 81, n. 2, p. 203-211, 1998.

ROMANI, R.J. Respiration, ethylene, senescence, and homeostasis in an integrated view of postharvest life. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 62, n. 12, p. 2950-2955, 1984.

ROMANI, R.J.; LABAVITCH, T.; YAMASHITA, B.; RAE, H. Preharvest AVG treatment of 'Bartlett' pear fruits: effects on ripening, color change and volatiles. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, n. 6, p. 1046-1049, 1983.

SACHER, J.A. Senescence and postharvest physiology. **Annual Review of Plant Physiology,** Palo Alto, v. 24, p. 197-224, 1973.

SALTVEIT, M.E.Jr. Internal carbon dioxide and ethylene levels in ripening tomato fruit attached to or detached from the plant. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 89, n. 1, p. 204-210, 1993.

SALTVEIT, M.E. Jr. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 15, n. 3, p. 279-292, 1999.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SELVARAJ, Y.; SUBRAMANYAN, M.D.; IYER, C.P.A. Changes in the chemical composition of four cultivars of papaya (*Carica papaya* L.) during growth and development. **Journal of Horticultural Science,** Kent, v. 57, p. 135-143, 1982.

SOLOMOS, T. Cyanide-resistant respiration in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology,** Palo Alto, v. 28, p. 279-297, 1977.

STAFFORD, H. Anthocyanins and betalains: evolution of mutually exclusive pathways. **Plant Science,** Limerick, v. 101, n. 2, p. 91-98, 1994.

TATAGIBA, J.S.; LIBERATO, J.R.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J.A.; COSTA, H. Controle e condições climáticas favoráveis à antracnose do mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira,** Brasilia, v. 27, n. 2, p. 186-192, 2002.

TAYLOR, N.L.; DAY, D.A.; MILLAR, A.H. Targets of stress-induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 55, n. 394, p. 1-10, 2003.

THARANATHAN, R.N.; YASHODA, H.M.; PRABHA, T.N. Mango (*Mangifera indica* L.), "the king of fruits" – an overview. **Food Reviews International,** Philadelphia**,** v. 22, n. 2, p. 95-123, 2006.

THEOLOGIS, A. One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. **Cell,** Cambridge, v. 70, n. 2, p. 181-184, 1992.

THOMPSON, J.E. Physical changes in the membranes of senescing and environmentally stressed plant tissues. In: SHINITZKY, M. (Ed.). **Physiology of membrane fluidity.** v. 2. Boca Raton: CRC Press, 1984. p. 85-108.

THOMPSON, J.E.; MAYAK, S.; SHINITZKY, M.; HALEVY, A.H. Acceleration of membrane senescence in cut carnation flowers by treatment with ethylene. **Plant Physiology,** Waterbury, v. 69, n. 4, p. 859-863, 1982.

TIAN, M.S.; PRAKASH, S.; ELGAR, H.J.; YOUNG, H.; BURMEISTER, D.M.; ROSS, G.S. Responses of strawberry fruit to 1-methylcyclopropene (1-MCP) and ethylene. **Plant Growth Regulation,** v. 32, n. 1, p. 83-90, 2000.

TRAINOTTI, L.; FERRARESE, L.; VECCHIA, F.D.; RASCIO, N.; CASADORO, G. Two different endo-β-1,4-glucanases contribute to the softening of the strawberry fruits. **Journal of Plant Physiology,** Jena, v. 154, n. 3, p. 355-362, 1999.

TRAINOTTI, L.; PAVANELLO, A.; CASADORO, G. Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries: does such an increment imply a role for ethylene in the ripening of these non-climacteric fruits? **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 56, n. 418, p. 2037-2046, 2005.

TRAINOTTI, L.; SPINELLO, R.; PIOVAN, A.; SPOLAORE, S.; CASADORO, G. β-galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 52, n. 361, p. 1635-1645, 2001.

TUCKER, G.A. Introduction. In: SEYMOUR, G.B.; TAYLOR, J.E.; TUCKER, G.A. (Eds.). **Biochemistry of fruit ripening.** London: Chapman & Hall, 1993. p. 1-51.

UEDA, T.; SEO, S.; OHASHI, Y.; HASHIMOTO, J. Circadian and senescence enhanced expression of a tobacco cysteine protease gene. **Plant Molecular Biology,** Dordrecht, v. 44, n. 5, p. 649-657, 2000.

VIEGAS, P.R.A. Características químicas e físicas do mamão (*Carica papaya* L.) cultivares 'Sunrise Solo' e 'Formosa' relacionados ao ponto de colheita. 1992. 82f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa-UFV, Viçosa.

WANG, B.; WANG, J.; LIANG, H.; YI, J.; ZHANG, J.; LIN, L.; WU, Y.; FENG, X.; CAO, J.; JIANG, W. Reduced chilling injury in mango fruit by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and the antioxidant response. **Postharvest Biology and Technology,** v. 48, n. 2, p. 172-181, 2008.

WANG, S.Y.; JIAO, H. Changes in oxygen-scavenging systems and membrane lipid peroxidation during maturation and ripening in blackberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington, v. 49, n. 3, p. 1612-1619, 2001.

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

WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBARTELS, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN CAMP, W. Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defence in C_3 plants. **The EMBO Journal,** v. 16, n. 16, p. 4806-4816, 1997.

WILLEKENS, H.; INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M.; VAN CAMP, W. Catalases in plants. **Molecular Breeding,** v. 1, n. 3, p. 207-228, 1995.

WILLS, R.B.H.; KIM, G.H. Effect of ethylene on postharvest life of strawberries. **Postharvest Biology and Technology,** v. 6, n. 3-4, p. 249-255, 1995.

WOLUCKA, B.A.; VAN MONTAGU, M. GDP-mannose 3',5'-epimerase forms GDP-L_gulose, a putative intermediate for the novo biosynthesis of vitamin C in plants. **Journal of Biological Chemistry,** Baltimore, v. 278, n. 48, p. 47483-47490, 2003.

YE, Z.; RODRIGUEZ, R.; TRAN, A.; HOANG, H.; SANTOS, D. de los; BROWN, S.; VELLANOWETH, R.L. The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science,** Limerick, v. 158, n. 1-2, p. 115-127, 2000.

ZHENG, X.; VAN HUYSTEE, R.B. Anionic peroxidase catalysed ascorbic acid and IAA oxidation in the presence of hydrogen peroxide: a defence system against peroxidative stress in peanut plant. **Phytochemistry**, New York, v. 31, n. 6, p. 1895-1898, 1992.

ZHOU, L.; PAULL, R.E. Sucrose metabolism during papaya (*Carica papaya*) fruit growth and ripening. **Journal of the American Society for Horticultural Science,** Palo Alto, v. 126, p. 351-357, 2001.