

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

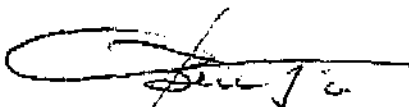
Aline Andréia Cavalari



**“Modificações da Parede Celular de frutos do mamoeiro
(*Carica papaya* L.) em diferentes estádios do
desenvolvimento.”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Aline Andréia Cavalari</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Vegetal na área de
Fisiologia Vegetal.


Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Marcos Silveira Buckeridge

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C314m	Cavalari, Aline Andréia Modificações da parede celular de frutos do mamoeiro (<i>Carica papaya</i> L.) em diferentes estágios do desenvolvimento / Aline Andréia Cavalari. – Campinas, SP: [s.n.], 2009. Orientador: Marcos Silveira Buckeridge. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Mamão. 2. Parede celular vegetal. 3. Hidrolases. 4. Oligossacarídeos. I. Buckeridge, Marcos Silveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
--------------	---

Título em inglês: Modifications of the cell wall of fruits of papaya (*Carica papaya* L.) at various stages of development.

Palavras-chave em inglês: Papaya; Plant cell wall; Hydrolases; Oligosaccharides.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutor em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Marcos Silveira Buckeridge, Eduardo Purgatto, Jurandi Gonçalves de Oliveira, Claudia Regina Baptista Haddad, Ângelo Pedro Jacomino.

Data da defesa: 28/01/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Campinas, 28 de janeiro de 2009

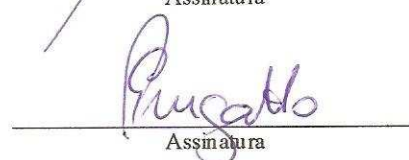
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge (Orientador)



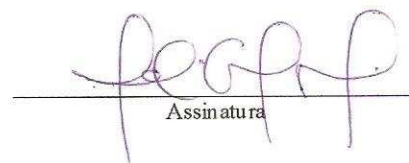
Assinatura

Prof. Dr. Eduardo Purgatto



Assinatura

Prof. Dr. Jurandi Gonçalves de Oliveira



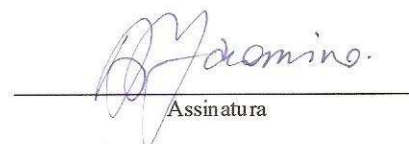
Assinatura

Profª. Dra. Claudia Regina Baptista Haddad



Assinatura

Prof. Dr. Angelo Pedro Jacomino



Assinatura

Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos

Assinatura

Prof. Dr. João Paulo Fabi

Assinatura

Dr. Milton Massao Shimizu

Assinatura

Dedico essa tese a meus pais, Pedro Ap. Cavallari & Luzia Alves Cavallari

Agradecimentos

Agradeço a **Deus** por ter me dado a oportunidade de estudar e aprender uma profissão.
Agradeço a pré- banca e Banca examinadora deste trabalho e também a **Maria Rosely**, pela atenção com os tramites da defesa.

Agradeço a meu Orientador, meu querido **Marcos S. Buckeridge**, pela oportunidade de aprender tanto sobre uma estrutura única, a Parede Celular das Plantas.

Agradeço-o também pela oportunidade de organizar, gerenciar e até mesmo montar um laboratório e em especial pelo aprendizado na pesquisa de ponta, além é claro da compreensão dos meus limites e amizade dedicada nestes 4 anos de convivência. Espero poder sempre trabalhar com você.....

Agradeço em especial a meu Marido **Tiago V. Corete**, que esteve sempre ao meu lado. Pelas noites de sonho que perdeu tentando me acalmar, pelos sorrisos quando eu vencia e até mesmo pelas "bronquinhos", quando eu precisava..... Sem muitas palavras.... Te Amo!

Agradeço a minha família, aos meus sogros e todos os parentes..... em especial minha irmã **Enila** por cuidar dos meus pais enquanto eu me dedicava aos estudos.

Agradeço á todos do IBT, onde fiz muitos amigos... tanto na seção de Fisiologia Vegetal, quanto no alojamento, onde morei por dois anos.

Quanto a Seção de Fisiologia Vegetal, as palavras me faltam, pois foi o lugar mais maravilhoso que passei em minha caminhada profissional..... A todos sem exceção, só tenho a agradecer!!!

Alguns agradecimentos especiais:

Pinho, Top, Dri e Gi... sempre juntas... conquistamos um novo lar.. a USP... obrigada por estarem sempre comigo, vocês são amigas para sempre!!!

Ao Depto de Fisiologia Vegetal da USP, os meus agradecimentos, pelo acolhimento e muito profissionalismo. Gostaria aqui de deixar meu agradecimento em especial ao querido **Prof.**

Gilberto Kerbaui, um profissional exemplar!

Em especial, agradeço por toda ajuda profissional: **Tiné, Luordes, C1 e Márcia Braga**.

Em especial as minhas queridas amigas **Marilha Gaspar, Pinho, Top e Kelly**, muito obrigada pela amizade e ajuda profissional.

Agradeço aos professores e pesquisadores do depto de Nutrição Experimental da Farmácia/ USP (**João Nascimento, Beatriz Cordenunsi, João Fabi, Rose, Franco Lajolo** e em especial ao **Eduardo Purgatto** participantes do Projeto Temático (2002/124529).

Agradeço ao **Centro Universitário São Camilo/ SP e A Universidade Padre**

Anchieta/Jundiá pela oportunidade de lecionar o que gosto, e em especial aos Coordenadores do curso, Dra. Viviane Alves e Sérgio Seike. Agradeço também todos meus **alunos** e meus colegas professores.

Agradeço a fazenda **Caliman S/A** pela doação dos frutos e hospitalidade

Agradeço a **FAPESP** pelo auxilio técnico e financeiro deste presente trabalho e por fazê-lo em toda minha caminhada acadêmica.

Sumário

1.INTRODUÇÃO	1
1.1 DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS.....	2
1.2 A PAREDE CELULAR E SUAS CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS.....	7
1.2.1 POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR	11
a) Celulose	11
b) Hemicelulose (xiloglucanos).....	11
c) Hemicelulose (galactomananos).....	12
d) Pectinas	12
1.3 CARACTERIZAÇÃO DA PAREDE CELULAR DO FRUTO DO MAMOEIRO E A AÇÃO DAS HIDROLASES.	15
1.4 ESTRUTURA E ALGUMAS FUNÇÕES DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE XILOGLUCANO (OXG) EM PAREDE CELULAR VEGETAL	20
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 MATERIAL:	24
3.2 ANÁLISE DE CARBOIDRATOS	
a) Remoção de açúcares solúveis.....	25
b) Fracionamento da parede celular:	25
c) Quantificação de carboidratos	25
d) Análise de monossacarídeos por HPAEC/ PAD:	26
3.3 OBTENÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE XILOGLUCANO (OXG).....	26
3.4 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE HIDROLASES:	27
3.4.1 ENSAIOS ENZIMÁTICOS:	28
3.5 ANÁLISES HISTOLÓGICAS	29
3.6 EXTRAÇÃO DOS AÇÚCARES SOLÚVEIS.....	30
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. AÇÚCARES SOLÚVEIS E REDUTORES NOS DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DO FRUTO.	31
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA PAREDE CELULAR EM FRUTOS DO MAMOEIRO EM DIFERENTES ESTÁDIOS DESENVOLVIMENTO (DIAS APÓS ANTESE).....	36
4.3 OLIGOSSACARÍDEOS (OXG) NOS DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DO FRUTO	43
4.4 SECÇÕES HISTOLÓGICAS DO MESOCARPO EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DO FRUTO	49
4.5 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS NOS DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DO FRUTO.....	54
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

RESUMO

A parede celular é um componente particular dos tecidos vegetais e conhecer a composição dos polissacarídeos que a constituem e suas interações é essencial para compreender a textura dos alimentos e suas alterações pós-colheita, em especial em frutos climatérios, como é caso do mamão. A parede celular está dividida por três domínios: o primeiro é formado por celulose e hemiceluloses, o segundo domínio é formado por pectinas e o terceiro um domínio composto por proteínas. As modificações dos polímeros e suas proporções nestes respectivos domínios são resultados de ações enzimáticas, que no caso dos frutos carnosos, leva ao amaciamento da polpa. Portanto, estudar as modificações nesses polímeros através da análise dos OXG obtidos por hidrólise com celulase, é um caminho importante para entender as alterações neste polissacarídeo ao longo do desenvolvimento de frutos. O presente trabalho teve como objetivo compreender as modificações da parede celular durante o desenvolvimento do fruto do mamoeiro. Foram utilizados frutos de *Carica papaya* L. cv. Sunrise solo, coletados diretamente do produtor (Caliman S/A- Linhares- ES). As amostras de frutos foram colhidas em intervalos de 30 dias, sendo os estádios analisados de 30 a 150 após a antese (dpa). Os resultados demonstram queda acentuada na proporção de parede celular em relação a outros compostos, como açúcares, por exemplo, o que é possivelmente uma indicação do processo de expansão celular e conseqüentemente uma alteração de textura da parede celular durante o desenvolvimento.

Observou-se que o principal açúcar solúvel é a sacarose, sendo esta provavelmente a principal fonte energética para o desenvolvimento do fruto de mamão, uma vez que este não sintetiza amido. De maneira geral, a proporção de oligossacarídeos de xiloglucano menos ramificados diminuiu aos 120 dpa, enquanto que os de maior peso molecular e ou grau de ramificação (com fucose) aumentaram proporcionalmente. Estes resultados sugerem que xiloglucanos (ou parte das moléculas destes) pobremente ramificados com fucose, são retirados da parede celular, consequente enriquecimento de oligosacarídeos fucosilados. Como estes últimos tornam o xiloglucano mais interativo com ele próprio e com a celulose, é possível que estes sejam os principais efeitos que as transformações na parede promovam no fruto. As alterações na parede foram acompanhadas pelo aumento concomitante nas atividades de beta-galactosidase e beta-glucosidase, duas das principais hidrolases de xiloglucano. Concomitantemente, observou-se uma diminuição acentuada na proporção de celulose na parede. Com base nestas observações, sugere-se que as paredes celulares sofrem transformações importantes nos frutos do mamoeiro até os 120 dpa, sendo que a partir deste estágio a parede se torna mais acessível à hidrólise e denotando a preparação do fruto para o amadurecimento.

Abstract

The plant cell wall is a unique component of plant tissues and its polysaccharide composition is essential to understand food texture and its changes during post-harvesting, especially of climateric fruits, as is the case of papaya. The plant cell wall is composed of three domains: the first is formed by cellulose and hemicelluloses, the second of pectins and the third of proteins. The changes in polymers and their proportions in these domains are a result of enzyme action, which in the case of fleshy fruits lead to the softening of the pulp. Hydrolysis of hemicelluloses such as xyloglucan can play important functions in cell expansion, cell growth and cell wall degradation. Therefore, studying the modifications in xyloglucan by looking at its fine structure (i.e. oligosaccharide (OXG) pattern obtained after cellulase action) may be an important way to understand polysaccharide change during fruit development. The present work aimed at understanding the modifications in cell wall during the development of the papaya fruit. Fruits of *Carica papaya* L. Cv.Sunrise solo, were collected directly by the producer (Caliman, SA, Linhares, Espírito Santo, Brazil). Samples of fruits were harvested at intervals between 30 and 150 days after anthesis (daa). Our results showed that there were drastic changes in the cell wall of the mesocarp in relation to other compounds, such as soluble sugars. This is probably an indication that cell expansion process is at least part of the cause of the changes in texture during development. We observed that the main soluble sugar found in fruits is sucrose, this

being probably the principal source of energy for development of the organ, as no starch is synthesised in this fruit. In general, the proportion of less branched xyloglucan oligosaccharides decreased at 120 daa, whereas the OXG branched with fucose increased constantly during development up to the same stage. These results suggest that xyloglucans (or part of their molecules) that are poorly branched with fucose are retrieved from the cell wall. This seems to lead to enrichment of fucosylation of xyloglucan. As these OXG turn xyloglucan more interactive with itself and with cellulose, it is possible that these would be the principal effects that the cell walls provoke in the fruit. The changes in the wall were followed by a concomitant increase in activities of beta-galactosidase and beta-glucosidase, both thought to be related to xyloglucan hydrolysis *in vivo*. At the same time, we observed a decrease in the proportion of cellulose in the walls during development. On the basis of these results, we suggest that the cell walls of papaya fruits undertake structural changes until 120 daa after which the wall becomes more accessible to hydrolases denoting the preparation of the papaya fruit for ripening.

1.INTRODUÇÃO

O interesse com relação aos componentes da parede celular para o melhor uso na alimentação vem crescendo sensivelmente. Tal crescimento se deve principalmente à importância que as fibras alimentares adquiriram no final do século XX, por possuírem propriedades que interferem na textura dos vegetais, sendo muito utilizado pelo homem no auxílio da digestão e melhora da constipação (Buckeridge *et al.* 2006).

Sendo a parede celular encontrada é em tecidos vegetais, entender a estrutura dos polissacarídeos e suas interações são essenciais para compreender a textura dos alimentos e suas alterações pós-colheita, em especial em frutos climatérios, como é caso do mamão.

Em frutos, os estudos concentraram-se principalmente no processo de amadurecimento, o qual é um dos estádios que mostra claramente alterações de textura, associadas principalmente à degradação na parede celular.

A principal função ecológica dos frutos na natureza é primeiramente a proteção e posteriormente a dispersão de suas sementes. O desenvolvimento o fruto é completado por uma seqüência de estádios com modificações fisiológicas e bioquímicas que levam à senescência e subsequente liberação das sementes encontradas internamente ao fruto.

A formação do fruto inicia-se com a fecundação do óvulo, quando então ocorre o disparo do programa de desenvolvimento, o qual pode ser caracterizado pela ativação gênica diferencial, promovendo então a formação dos tecidos. Nesta etapa, os principais eventos metabólicos estão relacionados à divisão celular e biossíntese de componentes da parede celular.

No processo de amadurecimento, predominam as reações catabólicas na parede celular. Os polímeros da parede celular são degradados por hidrolases específicas, provocando mudanças expressivas na textura do fruto. Ocorrendo em paralelo, modificação do aroma, do sabor e do potencial nutritivo de muitos frutos. Essas características funcionam como componentes de atração de herbívoros, que ao se alimentarem da polpa ajudam na dispersão das sementes (Taiz & Zeiger 2004; Kerbauy 2008).

1.1 DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS

A partir da polinização bem sucedida inicia-se o crescimento do rudimento seminal, o qual é conhecido como estabelecimento do fruto, do inglês "*fruit set*". Após a fertilização, o crescimento do fruto depende da auxina produzida nas sementes em desenvolvimento. O endosperma contribui com a produção de auxina durante o estágio inicial do crescimento do fruto e dos embriões em desenvolvimento podem ser a fonte principal da auxina durante os estádios seguintes (Appetzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro, 2006).

Morfologicamente os frutos carnosos dividem-se em epicarpo, mesocarpo e endocarpo, como observado na Figura 1. O epicarpo é formado geralmente por epiderme unisseriada que pode, do mamão, ser glabra e estomatífera. O mesocarpo é constituído por células parenquimáticas. Finalmente o endocarpo é de natureza parenquimatosa e encontra-se totalmente aderido à semente, sendo que suas células mais externas são alongadas, de parede fina e ricas em açúcares, onde também podem ser observados feixes vasculares muito finos (Appetzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro, 2006).

O mamão é considerado um fruto carnoso. Sua polpa é constituída de células parenquimatosas, de características poliédricas ou alongadas com paredes primárias sem espessamento secundário, conferindo certa elasticidade ao tecido, sendo separadas umas das outras pela lamela média ou por espaços intercelulares (Brett & Waldron 1996).

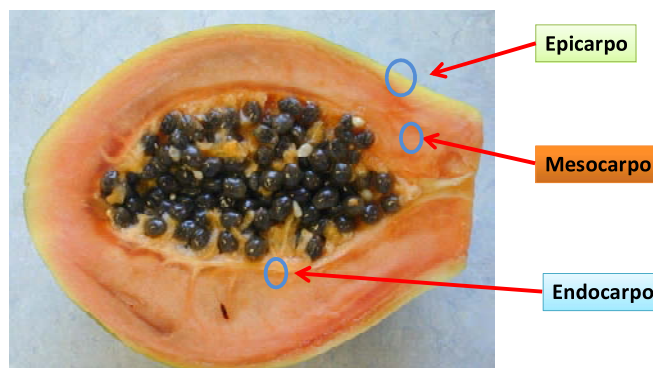


Figura 1. Foto com identificação morfológica das porções histológicas do mamão (epicarpo, mesocarpo e endocarpo). Foto cedida pelo Dr. Jurandi G. Oliveira -UENF-RJ.

O desenvolvimento dos frutos inicia-se com a fertilização, que é seguida pelas etapas de formação: crescimento, maturação, amadurecimento e senescência. O crescimento inclui multiplicação das células e o seu aumento em volume. A maturação inicia-se antes que o crescimento termine e inclui uma série complexa de transformações que variam conforme o fruto. Já durante a fase do amadurecimento, há um balanço entre processos de síntese e degradação dos polímeros da parede celular e dos vários compostos intra e inter celulares, pois é nesta fase que os principais processos de transformação do fruto ocorrem. A senescência é à fase em que os processos de degradação passam a predominar, levando a morte dos tecidos (Taiz & Zeiger 2004; Kerbauy 2008).

A partir dos trabalhos de Watada *et al.*, (1984) pode-se definir as fases de desenvolvimento do fruto, sendo elas:

Crescimento: fase onde processos bioquímicos geram atributos fisiológicos para o total desenvolvimento do fruto.

Maturidade Fisiológica: estágio do desenvolvimento onde o fruto já pode ser destacado da planta mãe, pois sua morfologia e fisiologia já esta definida e muitas vezes completada.

Amadurecimento: estágio que faz parte do estágio de senescência.

Senescência: Processos finais da maturidade fisiológica, culminando na morte dos tecidos.

É importante salientar que todos os estádios descritos acima, não possuem tempos cronometrados de início nem de término. Os estádios são estipulados a partir de diferenças conspícuas na morfofisiologia dos frutos em estudo.

Para cumprir seu papel ecológico, a dispersão de suas sementes, o fruto sofre mudanças na coloração, passando de verde-escuro para verde-claro, ou até mesmo para cores mais distintas, como vermelho, amarelo e outras. Isso se deve à degradação da clorofila e a síntese, ou “desmascaramento” de outros pigmentos amarelos, vermelhos e alaranjados (Taiz & Zeiger 2004).

Alguns desses pigmentos, principalmente as antocianinas e os carotenóides, poderiam já estar presentes no fruto verde, sendo revelados com destruição da clorofila, como ocorre com a acerola, ciriguela, cajá e pitanga (Alves, 1993; Costa, 1998; Santos, 2001).

No caso do fruto do mamoeiro, como demonstrado por Calegario (1997) o desenvolvimento completo do fruto leva entre quatro e sete meses, dependendo das condições climáticas, como temperatura e umidade relativa do ar (Figura 2). O crescimento é uma fase do desenvolvimento muito influenciada pelos fatores ambientais, portanto alterações climáticas podem

aumentar ou diminuir o número de dias que o fruto leva para completar seu desenvolvimento.

No trabalho de Berilli *et al.*, (2006), com estudos de “Graus dia” (o acúmulo de calor, expresso em graus-dia (GD)), os autores observaram que somente a partir dos 800 GD, os frutos do mamoeiro atingiram comprimentos e diâmetros próximos ao tamanho máximo de colheita.

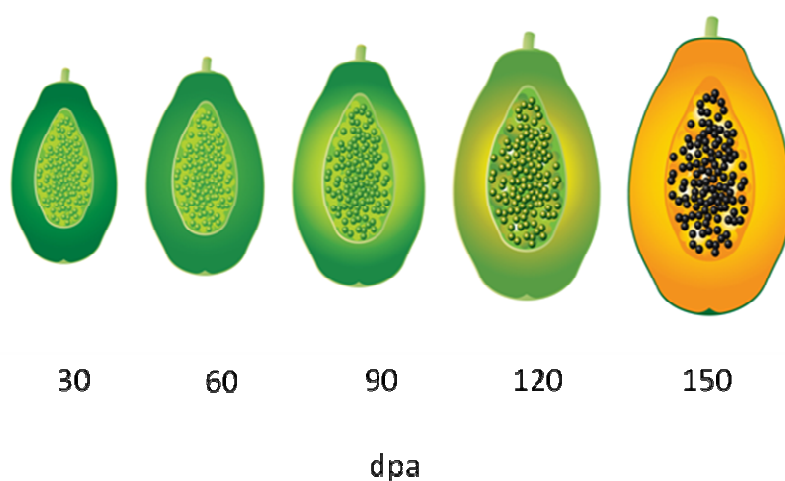


Figura 2. Esquema das diferentes fases do desenvolvimento dos frutos do mamoeiro em corte longitudinal (dpa= dias após antese). Ilustração feita por Osmir Valler Junior-Canadá/2008.

O estágio de desenvolvimento no momento da colheita afeta a qualidade pós-colheita e o armazenamento dos frutos. Estudos de crescimento e desenvolvimento do fruto são necessários, pois oferecem dados que subsidiam a escolha de características indicativas do ponto de colheita ideal. Por ser um fruto climatérico (frutos que possuem um incremento na taxa respiratória em resposta da síntese de etileno) o mamão pode ser colhido quando atinge sua maturidade fisiológica, com o objetivo de ser enviado para mercados mais distantes.

Como salientado por Fabi (2007), do ponto de vista comercial, enquanto o amadurecimento de frutos promove incrementos em termos de qualidade sensorial e nutricional, ele aumenta a suscetibilidade para dispersão dos frutos, principalmente pela diminuição da firmeza da polpa e casca, como é o caso do mamão. Esse amolecimento predispõe os frutos às injúrias causadas pela manipulação durante e após a colheita e a microrganismos patogênicos oportunistas, aumentando os desafios tecnológicos atuais. Deste modo, o aprimoramento das técnicas de produção e manejo pós-colheita podem resultar em uma diminuição das perdas e facilitar a distribuição desses alimentos, trazendo benefícios nutricionais e econômicos importantes.

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) originário da América tropical adaptou-se muito bem no Brasil, o qual se tornou o maior produtor mundial e o terceiro exportador desse fruto. Os Estados da Bahia e do Espírito Santo concentram mais de 70% da área cultivada e da produção do país (Paiva, 2008). É uma planta frutífera com alto potencial comercial em razão da grande aceitação de seus frutos doces, polpa espessa e alto valor nutritivo. A cultivar mais explorada no Brasil é a do grupo Solo (ex; “*Sunrise solo*”), mais conhecida como Papaya ou Havaí.

Segundo o Instituto Brasileiro de Frutas (IBRAF), em 2008 o Estado do Espírito Santo foi o maior produtor e exportador mundial de mamão, seguido pelo México (IBRAF, 2008).

Estudos da FAO indicam que em 2010 a produção mundial do mamão poderá ser de 12 milhões de toneladas. Neste sentido, o desafio do setor é sem dúvidas manter essa liderança sem prejudicar a rentabilidade. Muitas ações já foram estipuladas, sendo uma delas a busca pela qualidade, sendo que no campo o grande desafio é manter a qualidade mesmo perante as

diversidades climáticas e as doenças que atacam o cultivo. Além disso, o setor necessita investir mais em pesquisas, pois a manutenção da qualidade depois do produto colhido é a grande dificuldade de ampliar as exportações de mamão, principalmente para os compradores mais distantes (Encontro Papaya Brasil, 2005).

1.2 A PAREDE CELULAR E SUAS CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS

As células vegetais são delimitadas por uma parede celular, o que confere a elas força e resistência mecânica. A parede celular define a forma e o tamanho das células, controla a expansão celular, atua no transporte intracelular, armazena compostos de reservas, entre outras funções (Buckeridge *et al.*, 2008).

A parede celular participa ainda da manutenção do ambiente iônico da célula, modulando não apenas a passagem de íons, mas também de componentes químicos neutros agindo também no controle do potencial hídrico da célula (Waldron e Brett, 1990).

O equilíbrio entre as forças de tensão e coesão e as propriedades de cristal líquido da parede celular vegetal é fundamental para a planta, pois, ao mesmo tempo em que certos tecidos vegetais têm que ser extremamente delicados de forma que células na polpa de um fruto “estourem” e deixe o conteúdo intracelular à disposição dos animais, fenômeno este ligado à dispersão das sementes (Buckeridge *et al.* 2008).

Essa diversidade de funções reflete-se na diversidade de composição da parede celular vegetal, sendo esta dividida por três domínios: domínio microfibrilar (celulose-hemicelulose), domínio denominado matriz (pectinas) e domínio das proteínas.

O domínio microfibrilar da parede celular é constituído basicamente de celulose e hemicelulose. As microfibrilas de celulose são envolvidas por hemiceluloses, conferindo rigidez e resistência para a parede (Buckeridge, *et al.* 2008).

O domínio celulose-hemicelulose, interligado por polímeros de hemiceluloses, encontra-se imerso no segundo domínio, formado por uma matriz de polissacarídeos ricos em ácidos galacturônicos, a matriz pécica (Crosgrave, 1997; Buckeridge *et al.*, 2000; Carpita & McCann, 2000) .

A rede de celulose e hemicelulose fornecem força tensora, enquanto a rede de pectina está relacionada com a resistência à compressão (Alberts *et al.*, 1997). O terceiro domínio consiste de proteínas estruturais e enzimas, que têm grande importância na mobilização dos carboidratos de reserva de parede (Carpita & McCann, 2000; Buckeridge, 2008). Abaixo encontra-se um esquema proposto por Buckeridge *et al.* (2008), o qual se refere a um corte transversal da parede celular primária vegetal e à interação de seus componentes (Figura 3).

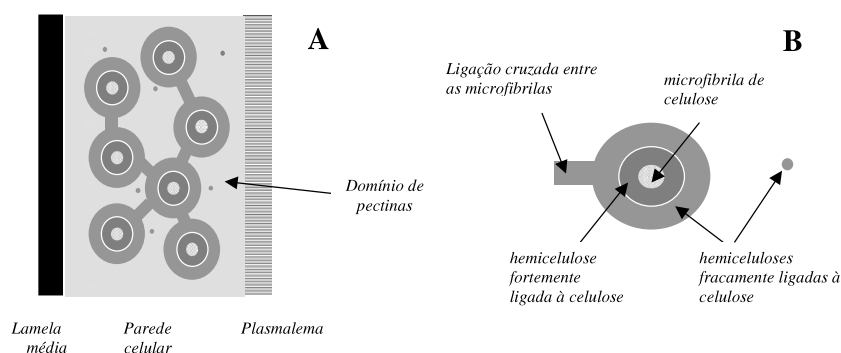


Figura 3. Representação esquemática da parede celular primária **(A e B)** em corte transversal. (A) corte transversal da parede celular completa e (B) esquematização dos domínios de celulose e hemiceluloses (Buckeridge M, S; Cavalari A.A & Silva G, B. (2008) Parede Celular in Kerbauy G.B 2ed. Guanabara Koogan pg 431. Rio de Janeiro).

Carpita & Gibeaut (1993) propuseram que em angiospermas, as paredes poderiam ser divididas em paredes do tipo I e do tipo II. Na parede do tipo I, os xiloglucanos são as principais hemiceluloses e as proporções de cada componente como: celulose, hemiceluloses e pectinas, no total da parede seriam de aproximadamente 30% , com cerca de 10% de proteínas. A parede do tipo II é aquela característica de gramíneas (Poaceae). Esta parede, em contraposição à do tipo I, apresenta um teor bem menor de compostos pécticos e teores igualmente baixos de xiloglucanos.

Nas paredes do tipo II, a principal hemicelulose é o arabinoxilano e há também outro polissacarídeo denominado β -glucano ou glucano de ligação mista (Figura 4) (Buckerigde *et al.* 2008).

Posteriormente, estudos demonstraram que os β -glucanos são depositados principalmente nos tecidos em crescimento, mas predominantemente em plantas da família Poaceae (Carpita *et al.*, 1996; Carpita & Vergara, 1998).

Toda a diversidade das propriedades físico-químicas e biológicas das paredes celulares de diferentes tecidos pode ser explicada pelas diferentes combinações de compostos constituintes numa mesma planta, dependendo do tecido analisado.

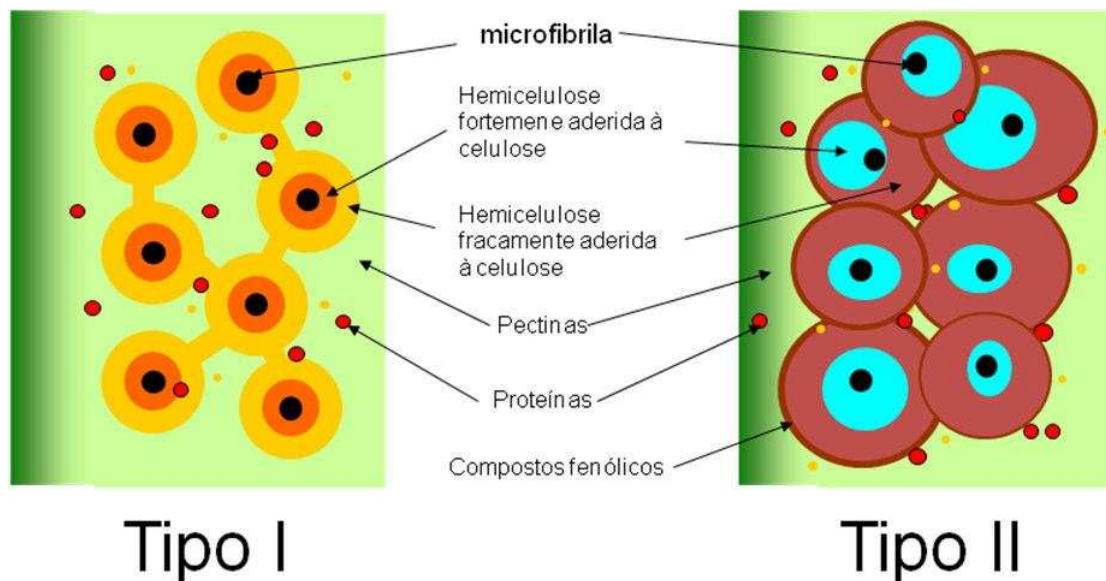


Figura 4. Arquitetura das paredes celulares dos tipos I e II proposta por Nick Carpita e David Gibeaut em 1993. Na parede do tipo I, o domínio celulose-hemicelulose é composto por xiloglucanos com diferentes tipos de ramificações que lhe conferem diferentes níveis de adesão às microfibrilas (tons de laranja). As proporções entre celulose, hemicelulose e pectinas são equilibradas. Na parede do tipo II, a principal hemicelulose é o arabinoxilano (azul). O polímero menos ramificado adere fortemente às microfibrilas (azul claro), enquanto os mais ramificados aderem entre si (preto). Diferente dos xiloglucanos, os arabinoxilanos parecem ligar-se por compostos fenólicos, que são mais abundantes nas paredes celulares do tipo II. Nas paredes do tipo II, a proporção de pectina é menor do que celulose e hemicelulose (Buckeridge M, S; Cavalari A.A & Silva G, B. (2008) Parede Celular in Kerbauy G.B 2ed. Guanabara Koogan pg 431. Rio de Janeiro).

1.2.1 POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR

a) Celulose : As microfibrilas de celulose são caracterizadas como longas cadeias lineares de glucose ligadas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. As microfibrilas de celulose são formadas em complexos protéicos denominados rosetas, os quais estão imersos no lado interno da membrana plasmática. A sacarose sintase forma um complexo com a celulose-sintase e atua como um canal metabólico para transferir glucose da sacarose via uridina-difosfato-glucose (UDPG), para o crescimento da cadeia do glucano (Crosgrave 1997). A celulose sofre pouca degradação durante a vida da planta, sendo degradada apenas em casos especiais como a formação de aerênquima durante o alagamento. Na maioria dos órgãos, tais como folhas, ramos, raízes e frutos, a maior parte da celulose persiste mesmo após a senescência ainda que haja expressão de endo-1,4-beta-glucanases (Lashbrook *et al.*, 1994) .

b) Hemicelulose (Xiloglucanos): Xiloglucanos são polímeros constituídos por uma cadeia celulósica (unidades de β -D-glucano ligado (1 $\rightarrow$ 4)), sendo parcialmente substituída por unidades de α -D-xilopirranose, β -D-galactopirranose-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-xilopirranose. Xiloglucanos de parede primária são também constituídos pelo motivo α -D-fucopirranose-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-galactopirranose-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-xilopirranose, ligados (1 $\rightarrow$ 6) à cadeia principal (Hayashi *et al.*, 1989). A maioria dos xiloglucanos é formada por blocos repetitivos contendo 4 unidades de glucose; 3 unidades de xilose; 0, 1 ou 2 unidades de galactose e 1 unidade de fucose (esta última somente para xiloglucano de parede primária) (Buckeridge *et al.*, 1992).

Estruturas de xiloglucanos podem ainda apresentar uma pequena

proporção de arabinose (Eda & Kato, 1978; Gidley *et al.*, 1991; Tiné *et al.*, 2000).

Nas paredes primárias, o xiloglucano está intimamente ligado à celulose, chegando inclusive a penetrar na microfibrila. O comprimento da cadeia de xiloglucano possibilita que uma mesma molécula estabeleça ligações com mais de uma molécula, ou seja, estabelecendo ligações cruzadas entre as moléculas e aumentando ainda mais a resistência da parede às forças externas (Hayashi, T. 1989). A principal função associada ao xiloglucano é a orientação das microfibrilas de celulose na parede celular (Hayashi, T. 1989, Lima & Buckeridge, 2001, Lima *et al.*, 2004). Na Figura 6 pode ser visto um esquema da estrutura química deste polímero.

c) Hemicelulose (Galactomananos): O (galacto)manano é composto de uma cadeia linear de manoses unidas entre si por ligações do tipo β 1,4 e que contém percentagens variadas de ramificações de galactose α 1,6 ligadas, o que está representado em forma de esquema na Figura 5.

Os galactomananos de diferentes origens apresentam proporções distintas entre os resíduos de manose e galactose (M/G). Esta proporção é importante porque ela caracteriza a solubilidade do polímero em água. Sendo assim, quanto maior a proporção de galactose, mais solúvel é o polímero (Buckeridge & Dietrich, 1996).

d) Pectinas: são caracterizadas por possuírem alto conteúdo de resíduos de ácido α -D galacturônico (GalA). Os três componentes quantitativamente mais importantes das pectinas são os homologalacturonanos (HGA) e os ramnogalacturonanos I (RG I) e II (RG II). São polissacarídeos pécticos: HGA homogalacturonano polissacarídeo com resíduos de ácido galacturônico α -1, 4, ligados. A cadeia principal do HGA pode apresentar blocos metilesterificados (neutros) alternados a blocos não-metilesterificados

(negativos). Os RG I possuem na cadeia principal resíduos de GalA α -1,4 ligados podendo ser acetilados e intercalados por resíduos de ramnose ligados no C₂ com polissacarídeos neutros como arabinanos, galactanos e arabinogalactanos do tipo I. RG II possui na cadeia principal composta de GalA α -1,4 ligados, com ramificações laterais formadas por ligações glicosídicas de vários tipos.

Uma das características peculiares das pectinas é que durante a divisão celular, ocorre o depósito deste polímero na lamela média, mantendo duas células adjacentes unidas. As substâncias pécticas, que compõem a lamela média e a parede primária dos vegetais, consistem de galacturonanos, arabinanos e arabinogalactanos (Brett & Waldron, 1996), os quais compõem a fração da parede celular, onde ocorrem muitas das alterações importantes durante o amadurecimento dos frutos (Fisher & Bennett, 1991).

É também sobre as pectinas que muitos dos estudos relativos à desmontagem da parede celular têm se concentrado ultimamente, sendo em parte alvo de nossas investigações no presente estudo.

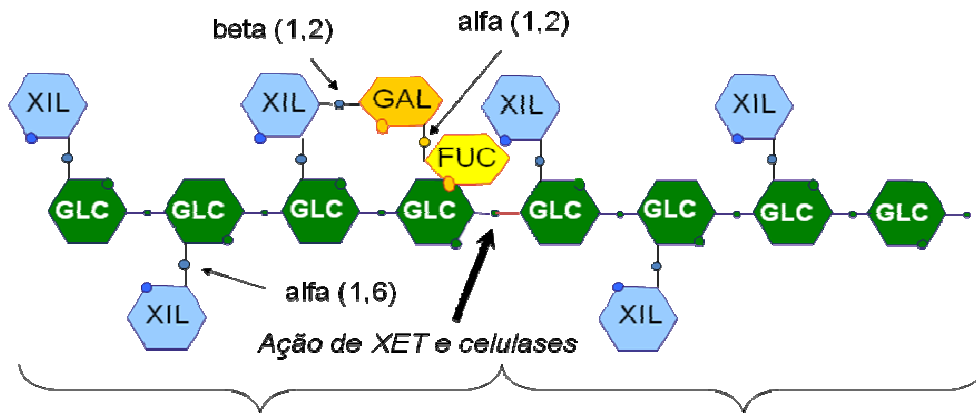


Figura 6. Estruturas químicas do xiloglucano. Note que a cadeia principal do xiloglucano possui blocos repetitivos (chaves) com quatro glicoses, três xiloses, galactose e fucose em proporções variáveis. XET e celulasas só conseguem quebrar as ligações beta-(1,4) da cadeia principal no ponto indicado com a seta. Xiloglucano endo transglicosilase (XET) GLC=glicose, XIL=xilose, GAL=galactose e FUC=fucose (Buckeridge M, S ; Cavalari A.A & Silva G, B. (2008) Parede Celular in Kerbauy G.B 2ed. Guanabara Koogan pg 431 Rio de Janeiro).

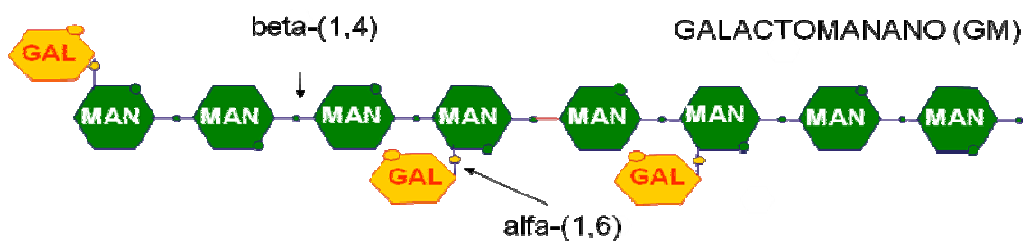


Figura 5. Modelo esquemático da estrutura química do galactomanano, mostrando a cadeia linear de unidades de manose (MAN) e suas ramificações com unidades de galactose (GAL) Buckeridge M, S; Cavalari A.A & Silva G, B. (2008) Parede Celular in Kerbauy G.B 2ed. Guanabara Koogan pg 431. Rio de Janeiro).

1.3 CARACTERIZAÇÃO DA PAREDE CELULAR DO FRUTO DO MAMOEIRO E A AÇÃO DAS HIDROLASES.

Biswas *et al.* (1969) analisaram a estrutura de um polímero péctico extraído com água e solução de oxalato de amônio da polpa do mamão. A composição de monossacarídeos liberados após a hidrólise ácida do polímero foi determinada por cromatografia em papel, resultando em 48% de ácido D-galacturônico, 38% de D-galactose, 5% de L-arabinose e traços de L-ramnose. Após a metilação e hidrólise do polissacarídeo, a análise dos produtos resultantes mostrou que 90% desse polímero consistia de uma mistura de homogalacturonanos com ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ e $\alpha(1\rightarrow3)$ e 8% de um galactano linear.

Lazan *et al.* (1995) estudaram possíveis funções de enzimas pécticas no amaciamento e nas modificações da parede celular durante o amadurecimento do mamão. Foram observados aumentos da solubilidade e despolimerização de pectinas. As hemiceluloses também pareceram sofrer degradação, embora tenha havido um aumento em seus teores, o que poderia estar relacionado com a hidrólise das pectinas e não necessariamente com a síntese de hemiceluloses. Por outro lado, a diminuição rápida da firmeza do mesocarpo na porção mais interna, em detrimento da porção mais externa, foi atribuída à falta de sincronismo entre os processos de degradação de pectinas e hemiceluloses nessas regiões, durante o amadurecimento do fruto.

As atividades das enzimas poligacturonases (PG) e das pectinametilesterases (PME) aumentam continuamente conforme a solubilização das pectinas. No entanto, a atividade da β -galactosidade aumentou rapidamente apenas nos últimos estádios de amadurecimento, coincidindo com a queda mais acelerada da firmeza do fruto e com as

mudanças estruturais mais significativas dos polissacarídeos da parede celular (Lazan *et al.* 1989). Assim, sugeriu-se que a solubilização e a despolimerização seriam dois processos independentes e que a PG teria um papel importante apenas na solubilização das pectinas, sem envolvimento no processo de amaciamento. Lazan *et al.* (1995) verificaram que embora a β -galactosidase se apresentasse como possível enzima correlacionada com o amaciamento, sua atividade no mesocarpo interno foi menor do que no externo, contrastando com o amaciamento observado nesses tecidos.

Foram caracterizadas algumas mudanças do peso molecular de frações pécticas e hemicelulósicas isoladas do mamão em três estádios de amadurecimento, sendo sugerida a ocorrência de hidrólise de pectinas e modificações das hemiceluloses no processo de amaciamento do fruto (Paull *et al.*, 1999).

Manrique & Lajolo (2004), em estudos sobre as modificações dos polissacarídeos em mamão durante o amadurecimento, observaram que existe alta atividade da β -galactosidase e sugerem que juntamente com a atividade de xiloglucano endo-transglicosilase (XET), ocorra a diminuição da firmeza da polpa do fruto em conjunto com a diminuição do peso molecular dos polissacarídeos da parede celular. Através dos níveis de metilesterificação entre as frações pécticas, os autores sugerem que deveria existir uma forte participação da pectinametilesterase (PME) nos mecanismos de amolecimento do fruto, envolvendo o aumento da solubilidade ou mudanças na matriz estrutural dos polímeros. Em conclusão, os autores afirmam que os eventos de despolimerização e solubilização são independentes.

No processo de hidrólise as enzimas alteram as paredes celulares primárias, modificando sua arquitetura e contribuindo para o amolecimento

da polpa. Antigamente o amolecimento da polpa de frutos carnosos era associado apenas à degradação das pectinas, porém estudos recentes indicam que a degradação das hemiceluloses e da celulose também contribuem para esse processo, amolecendo a polpa homogeneamente (Paull *et al.* 1999).

A modificação nas hemiceluloses associada às modificações estruturais na parede celular de frutos carnosos, foi reportada em morango (Huber, 1984), melão (Mc Collum *et al.*, 1989) e papaya (Lazan *et al.*, 1995; Ali *et al.*; 2004 ; Soh *et al.*; 2006).

O amolecimento da polpa do fruto observado durante o amadurecimento é caracterizado pelo aumento das pectinas solúveis em água, porém esse aumento não está relacionado com a queda de firmeza (Lazan *et al.*; 1995). Estudos mais recentes em frutos do mamoeiro mostram que os polímeros das paredes primárias estão ligados covalentemente e descrevem um modelo pectina-xiloglucano, arabinanos, galactanos e arabinogalactanos (Lazan *et al.*, 2004).

A poligacturonase (PG) catalisa a hidrólise das ligações α -1-4 de ácido poligalacturônico dos homogalacturanos, a princípio desesterificados, de forma aleatória (endo-PG, EC 3.2.1.15) ou a partir da extremidade não-redutora do ácido poligalacturônico (exoPG, EC 3.2.1.67). Já a PME (EC 3.1.1.11) desesterifica parcialmente a pectina pela clivagem hidrolítica dos grupamentos metila do grupo carboxílico dos ácidos galacturônicos (Fabi, 2007).

As glicosidases (EGase) hidrolisam ligações internas de cadeias de β -1-4-D-glicanos adjacentes a resíduos não-substituídos de forma irreversível, sendo elas as β -galactosidase (EC 3.2.1.23) e a β -glucosidase (EC 3.2.1.117).

A primeira remove resíduos de β -D-galactosil de terminais não redutores de β 1-4-D-galactanos, e só está presente em sua forma exo, isto é, não foi relatada nenhuma forma de atuação aleatória desta enzima em plantas superiores. A β glucosidase atua sobre as ligações β 1-4, sendo esta uma exocelulase com especificidade para uma das ligações β -D-glicosídeo. Ela catalisa a hidrólise dos resíduos terminais não-redutores em β -D-glicosídeos com liberação de glicose. Tais ligações β 1-4 podem estar presentes em oligossacarídeos de xiloglucanos ou de celulose (Rose *et al.*, 1998).

Em estudos com frutos do mamoeiro, Lazan *et al.* (1995) observaram que existem três isoformas de β -galactosidase (β -gal I, II e III), o que foi confirmado por Ali *et al.* (1998). Neste último trabalho, uma análise por SDS-PAGE mostrou que a β -gal I tem baixa atividade nas fases imaturas dos frutos do mamoeiro, aumentando sua atividade durante as fases de amadurecimento. Já as β -gal II e III são encontradas nas fases iniciais de desenvolvimento do fruto, diminuindo durante o amadurecimento.

Outra enzima relacionada com a degradação de hemicelulose é a α -galactosidase (EC 3.2.1.22) responsável pela quebra das ligações α -(1 $\rightarrow$ 6) galactoses em galactomanano. Porém a importância da α -galactosidase é progressivamente maior em sementes que possuem galactomananos com maior grau de ramificação de galactose, explicando níveis altos de atividade desta enzima durante a mobilização do galactomanano em espécies contendo polímeros altamente ramificados (Buckeridge *et al.* 2000). O galactomanano é um polímero também encontrado em mamão, mas em baixa proporção se comparado ao xiloglucano (Rose *et al.*, 1999). Soh *et al.* (2006), em ensaios com frutos do mamoeiro durante o amadurecimento, caracterizaram três isoformas de α -galactosidase, sendo que a isoforma α -gal II é predominante na fase de amadurecimento do fruto, possuindo alta

atividade na hidrólise dos galactomamanos, modificando potencialmente a estrutura do polissacarídeo, possuindo seu papel efetivo no desenvolvimento de frutos.

Quanto à XET (EC 2.4.1.207), a mesma possui uma ação endo-catalítica de β -1-4-D-glucanos assim como as EGases, porém de uma forma reversível, pois transfere o novo açúcar formado através da sua parte redutora para um carbono na posição quatro de um resíduo de glicose de outro xiloglucano em sua parte não-redutora com a retenção da configuração anomérica da ligação glicosídica.

Por fim, há as expansinas, que são proteínas localizadas nas paredes celulares e atuam provavelmente rompendo reversivelmente as ligações do tipo pontes de hidrogênio entre as hemiceluloses e a celulose o que pode resultar em uma perda de adesão celular (Brummell, 2006).

Em resumo, as alterações na parede celular de frutos em desenvolvimento, envolvem uma intensa e controlada atividade de hidrolases e transglicosilases, que culminam no afrouxamento das ligações intra e intermoleculares, auxiliando no crescimento e expansão celular (Hayashi, 1989).

As atividades enzimáticas também são responsáveis pela organização dos polímeros da parede celular como um todo. O alinhamento da celulose é atribuído à presença de moléculas de xiloglucano que interagem através de pontes de hidrogênio (Lisboa, 2008). Todo esse complexo é responsável pela resistência à pressão de turgor e pelo crescimento anisotrópico das células vegetais. Portanto, compreender essa relação entre os polímeros e suas enzimas “editoras” é essencial para analisarmos os dados de síntese e degradação dos polissacarídeos nas diferentes fases de maturação dos frutos.

A compreensão do xiloglucano é uma ferramenta chave de nossos estudos, sendo que essas análises serão observadas no decorrer deste trabalho. Para isso damos seqüência à contextualização do xiloglucano como um dos polímeros principais deste estudo.

1.4 ESTRUTURA E ALGUMAS FUNÇÕES DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE XILOGLUCANO (OXG) EM PAREDE CELULAR VEGETAL

O xiloglucano é composto por uma matriz de glucanos mais amplamente distribuída no reino vegetal (Carpita & Gibeaut 1993).

Como descrito no item 1.2.1, sua cadeia principal é composta de glucose ligada ($\beta 1,4$), com ramificações de xilose ligada ($\alpha 1,6$) e galactose ligada ($\alpha 1,2$). Na parede celular primária pode haver fucose ligada à galactose através de ligações ($\alpha 1,2$), sendo que esta substituição não ocorre no xiloglucano de reserva (Buckeridge et al. 1992). A principal função associada ao xiloglucano é a orientação das microfibrilas de celulose na parede celular (Lima e Buckeridge, 2001). Portanto, acredita-se que os xiloglucanos tenham papel fundamental no controle do crescimento e desenvolvimento de plantas (Carpita e Gibeaut, 1993).

Pela nomenclatura corrente (Fry *et al.*, 1993), os resíduos de glucose não ramificados são denominados G, enquanto os pontos da cadeia principal ramificados por xilose são denominados X e quando há ramificação com galactose, o trissacarídeo glucose-xilose-galactose é denominado L. Na parede primária ocorre ainda ramificação com fucose α -(1,6) e neste caso o tetrassarídeo é denominado F (Tin  , 2002). Tin   (1997) em estudo de mobiliza  o de reservas de sementes de jatobá, já mostrava indicativos de que os OXG gerados pela hidrólise do xiloglucano são “códigos” para posteriores lises do polímero. Em seus resultados o autor demonstra que é

Os OXG podem desempenhar funções regulatórias e /ou sinalizadoras na expansão e crescimento celular. Durante o metabolismo da parede celular ocorre a liberação de fragmento deste polissacarídeo (OXG), sendo que quando possui galactose em sua composição parecem atuar sinergisticamente com a auxina e quando apresentam fucose na sua estrutura, podem antagonizar o crescimento induzido por esses reguladores de crescimento (Oliveira Junior *et al.*, 2006). Portanto, estudar as modificações do xiloglucanos através da formação de OXG é o principal caminho a ser seguido para explicar as alterações encontradas neste polímero ao longo da maturação do fruto em estudo.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como principais objetivos compreender as modificações da parede celular durante o desenvolvimento do fruto do mamoeiro (fase pré-colheita), utilizando inicialmente as estratégias:

- a) Investigar a composição da parede celular de frutos do mamoeiro (*Carica papaya* L.), determinando as principais variações quantitativas e qualitativas nos polissacarídeos ao longo da maturação do fruto, principalmente nos estágios iniciais.
- b) Dosagem de açúcares solúveis totais e as proporções entre sacarose, glucose e frutose.
- c) Observar as modificações anatômicas no mesocarpo do fruto ao longo do desenvolvimento, através de cortes histológicos.
- d) Analisar os oligossacarídeos através da digestão com celulase e identificá-los em HPLC, com comparação aos oligossacarídeos de maçã utilizados como padrão.
- e) Correlacionar as variações na composição de polissacarídeos e degradação dos polímeros de parede, presentes durante o desenvolvimento do fruto, através da dosagem das atividades das principais hidrolases dos polissacarídeos (hemiceluloses) da parede celular dos frutos do mamoeiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL: Frutos de *Carica papaya* L. cv. Sunrise Solo foram coletados direto do produtor (Caliman Agrícola S/A- Linhares- ES). A região de produção, Linhares, apresenta temperaturas máximas entre 30°C e 32°C e mínimas entre 15°C e 18°C e a precipitação média anual é de 1200 mm. A amostragem preliminar foi realizada com cinco frutos colhidos aleatoriamente para cada amostra, em intervalos de trinta dias, no período compreendido entre 30 e 150 dias após a antese (período próximo da colheita). A Figura 8 mostra as fases dos frutos em estudo.

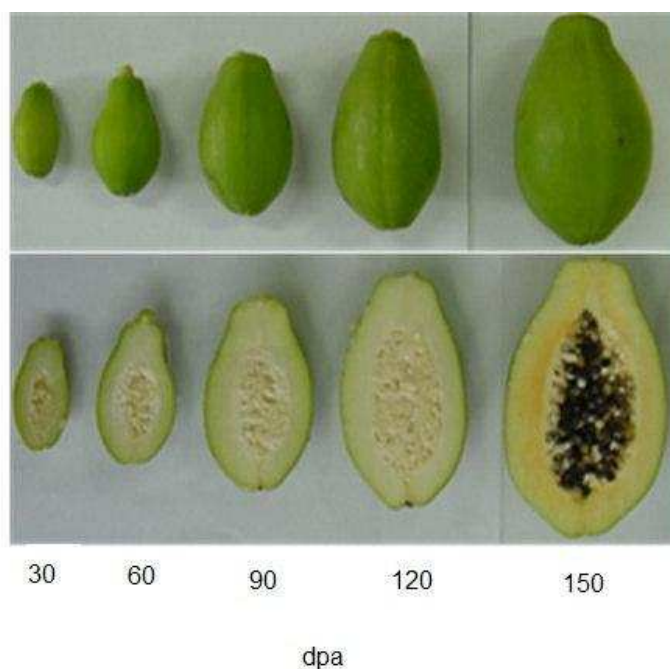


Figura 8. Foto dos frutos de *Carica papaya* L. cv. Golden (íntegros e cortados) em diferentes fases do desenvolvimento de trinta a cento e cinquenta dias após antese. Foto cedida pela Profa. Beatriz Cordenunsi- FCF/USP.

3.2 ANÁLISE DE CARBOIDRATOS

a) Remoção de açúcares solúveis: Amostras de 500 gramas liofilizados do mesocarpo dos frutos do mamoeiro foram liofilizadas e submetidas à remoção de açúcares solúveis em quatro extrações com 50mL de etanol a 80% e mantidos a 80°C por 20 minutos. Em seguida foram centrifugados a 10.000 g e os sobrenadantes descartados. Após a remoção dos açúcares solúveis o material foi seco em liofilizador.

b) Fracionamento da parede celular: Após a extração dos açúcares solúveis adicionou-se 50 mL de oxalato de amônio a 0,5%, pH 7, a 100° C por 1 h (4 X), sendo os resíduos coletados por centrifugação a 2700 g por 15 minutos a 25° C.

Os resíduos da extração anterior foram submetidos à extração (4 X cada) com 50 mL de hidróxido de sódio a 0,1M, resultando na fração solúvel em álcali fraco, e com 50 mL de hidróxido de sódio a 4M e a 8M para a obtenção da fração solúvel em álcali forte. Estas frações foram dialisadas e liofilizadas para que posteriormente o rendimento dos polímeros da parede celular fosse estimado. Com o material já liofilizado foi realizada a hidrólise ácida, com ácido sulfúrico 3% em 120 °C por 1h, para obtenção de seus monossacarídeos e futura análise em HPLC.

c) Quantificação de carboidratos: A quantificação de açúcares totais nas frações das paredes celulares foi efetuada pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956), sendo usada glicose (100 µg/ mL) como padrão.

d) Análise de monossacarídeos por HPAEC/ PAD:

Aproximadamente cinco miligramas das frações de paredes celulares foram hidrolisadas com 100mL de ácido sulfúrico a 72 %, e mantidas em banho a 30°C por 45 minutos em tubos cônicos graduados. Após o período de pré hidrólise, foram acrescentados aos tubos 1,7 mL de água destilada e os material autoclavado por 1 hora a 120°C e em seguida neutralizado com NaOH a 50%.

Os hidrolisados dos tratamentos foram recolhidos e analisados quanto à presença de monossacarídeos neutros por cromatografia de troca aniônica de alta performance com detector de pulso amperométrico (HPAEC/ PAD) em sistema Dionex DX500, coluna Carbo-Pac PA 1, em eluição isocrática com NaOH a 20 mM por 40 minutos. Os materiais considerados como resíduo também foram analisados neste sistema. Os perfis de eluição dos monossacarídeos presentes nos hidrolisados foram comparados com aqueles obtidos para padrões de monossacarídeos comerciais.

3.3 OBTENÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE XILOGLUCANO (OXG)

Para obtenção do padrão de OXG foi utilizada polpa de maçãs (*Malus malus* L., Rosaceae. Var. Golden Delicious), após remoção da casca. A polpa foi homogeneizada em liquidificador e o material foi coado em nylon (pele de ovo). O precipitado foi lavado exaustivamente em água destilada a 50°C.

Após extração em água, o precipitado foi seco em liofilizador e posteriormente extraído com 0,05N de NaOH contendo 5 mM de EDTA, por 16h a 4°C. Posteriormente foi realizada a extração com KOH a 1N e a 4N, ambos contendo NaBH₄ para reduzir os monossacarídeos do final redutor e evitar hidrólise alcalina. Os sobrenadantes foram dializados e liofilizados. A

fração contendo oligossacarídeos é a fração de 4N de KOH (Vincken *et al.*, 1994).

Para a obtenção dos oligossacarídeos de xiloglucano de frutos do mamoeiro, foram analisadas alíquotas da fração 4M de NaOH. Tanto o material liofilizado do mamão quanto do padrão de maçã, obtidos como descrito acima (xiloglucano 1%), foram hidrolisados com celulase da Megazyme 10U (unidade) em tampão acetato de amônio (50mM pH 5,5) por 36 horas em banho a 37°C. As análises foram feitas por HPAEC/PAD, coluna Carbo-PaC PA100 com detecção por pulso amperométrico (PAD).

O eluente constante foi NaOH a 88 mM com gradiente linear de acetato de sódio de 35-75 mM nos primeiros 20 min e posteriormente com aumento do gradiente até 200mM para os 30 min finais (total de 50 min de corrida). A coluna foi eluída em fluxo de 0,9 mL.min⁻¹

A identificação dos OXG foi confirmada por comparação com OXG da hidrólise do xiloglucanos de *Hymenaea courbaril* e *Copaifera langsdorffi* sob as mesmas condições conforme descrito por Buckeridge *et al.*, (1992). Este mesmo método foi aplicado para obtenção dos oligossacarídeos de maçã.

Para que os OXG de mamão fossem identificados em comparação aos OXG de maçã, já identificados por Vincken *et al.*, (1994), realizou-se a coinjeção dos OXG de ambos os frutos. Para isso foi feita uma mistura de 50% de OXG de mamão + 50% de OXG de maçã, os quais foram aplicados em HPLC conforme método descrito.

3.4 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE HIDROLASES:

Extração e determinação da atividade de β -galactosidase, α -galactosidase, β -glucosidase e EPG (endopoligalacturonase), foram feitas

com base em Lazan *et al.*, (1989), Lazan *et al.*, (1995) , Ali *et al.*, (1998) e Shon *et al.*, (2006), com modificações. Para cada 1g de mesocarpo fresco, macerado em nitrogênio líquido, foram adicionados 5mL de tampão acetato de Na (0,1M) a pH 4,6, contendo 1M de NaCl, 13mM de EDTA, β -mercaptoetanol (10mM), 25 μ M de antipaina e 100mg de PVP. A mistura foi mantida por uma hora a 4°C, com homogeneização ocasional.

Após uma hora em tampão de extração, o extrato foi centrifugado a 13000g (Sorvall Superspeed 5B) por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e sua quantidade de proteína foi dosada segundo o método de Bradford (1976).

3.4.1 ENSAIOS ENZIMÁTICOS:

a) α -galactosidase : 0,52 mL de tampão de acetato de sódio (50mM) a pH 5,5, 0,4mL de (p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo) a 6mM e 0,4mL de BSA (0,1%) foram mantidos a 37 °C por 10 min. Passado este tempo, adicionou-se 0,08mL do extrato enzimático e retornou-se ao banho por mais 15 min. Após incubação por 15 min a reação foi parada com adição de 2 mL de NaCO₃ (0,2M) e efetuada a leitura da absorbância em espectrofotômetro em 415 nm. Quanto às diferenças entre os ensaios das α -galactosidases 1, 2 e 3 (descritas no item 1.5), estas foram devidas aos pHs e concentrações do substrato utilizado. Para α -galactosidases (2 e 3) o pH foi de 3,0 e a concentração do substrato foi de 4mM. Já a atividade da α -galactosidase 1 foi dosada em pH 5,5 e a concentração do substrato foi de 6mM.

b) β -galactosidase: 0,56 mL de tampão acetato de Na (50mM) pH 4,0, contendo 0,2mg/mL de BSA, 0,2 mL de (p-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo) 13mM, foi mantido por 5min a 37°C. Passado este tempo, adicionou-se 0,04mL do extrato enzimático diluído 10 vezes e retornou-se ao banho por

15 min. A reação foi parada com adição 0,5 mL de NaCO_3 (0,5M) e efetuada a leitura em 405nm.

d) β -glucosidase : 0,560 mL de tampão acetato de sódio (50mM) pH 4,0, contendo 0,2mg/mL de BSA, 0,2 mL de (p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo) 13mM, foi mantido por 5min a 37°C. Em seguida, adicionou-se 0,04mL do extrato enzimático diluído 10 vezes e retornou-se ao banho por 15 min. A reação foi interrompida com adição de 0,5 mL de carbonato de sódio (0,5M) e efetuada a leitura em 405nm.

e) EPG (endo-poligalacturonase): 0, 980 mL de tampão acetato de Na (50mM) pH 5,5 contendo 1mg de substrato (ácido poligalacturônico), previamente lavado em etanol a 80% e 0,02mL de extrato enzimático, foi mantido em banho de 34°C por 2 horas. A reação foi parada em gelo e a sua atividade foi inferida pela dosagem de açúcares redutores (Somogy, 1952).

3.5 Análises histológicas

Neste ensaio foi utilizada uma amostra de 5 dpa, pois desta maneira teríamos um fruto onde as células poderiam estar em divisão e de tamanhos muito menores que nos outros estádios. As amostras foram fixadas em FAA 70 (formaldeído, ácido acético e álcool a 70%) por 24h e, posteriormente, mantidas em álcool a 70%. A desidratação ocorreu por meio de série butílica e a inclusão foi feita em parafina pura (Sass, 1951). O seccionamento transversal foi efetuado em micrótomo rotativo, do qual resultaram secções com espessura entre 5 e 7 μm ; as lâminas foram coradas com azul de astra e safranina, ambos a 1% e na proporção 9:1 (v/v) e montadas em resina Permunt. Os cortes foram analisados em microscópio óptico.

3.6 Extração dos açúcares solúveis

Após a coleta dos frutos, as amostras contendo apenas o mesocarpo foram congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas e armazenadas a -70°C antes de serem analisadas. O material foi macerado em almofariz em nitrogênio líquido e a extração dos açúcares foi feita com 5 mL de etanol a 80% para cada 1g de tecido liofilizado. Foram realizadas cinco extrações seqüenciais, cada uma com o mesmo volume de etanol, em tubos fechados em banho-maria a 80°C por 30 minutos, com agitação ocasional. Os extratos das cinco extrações foram combinados e submetidos à dosagem de açúcares solúveis totais - AST (Dubois *et al.*, 1956) e açúcares redutores - AR (Somogy 1952).

Para as análises dos açúcares em HPLC, 1mL do extrato etanólico foi seco em centrífuga concentradora a vácuo (speed-vac) e ressuspendido em 1mL de água deionizada e em seguida filtrado (Millipore 0,25µm) para análise de glucose, frutose e sacarose por Cromatografia de troca iônica de alto desempenho, com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) modelo DX 500 em coluna CarboPac PA-1 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA). A eluição foi isocrática com 200 mM de hidróxido de sódio em água, com fluxo de 1mL/min: 0-15 min em 50% de a NaOH a 200mM e 50% de H₂O, 15-20 min em 100% de NaOH a 200 mM, 20-25min em 50% de NaOH a 200mM e 50% de H₂O. As áreas de cada pico foram corrigidas de acordo com a sensibilidade do detector para cada açúcar.

3.7 Análises estatísticas

Foram utilizados os desvios padrão para cada resultado obtido e o mesmo utilizado para que pudesse ser feito um comparativo entre resultados das fases analisadas. Apenas nos dados referentes ao tamanho

das células, em cortes histológicos, foi utilizado a “Anova” o teste de “Tukey” a 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. AÇÚCARES SOLÚVEIS NOS DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DO FRUTO.

Foram analisados os teores de açúcares solúveis totais (AST) respectivamente entre os 30-150 dpa, cujos resultados quais podem ser observados nas Figuras 9.

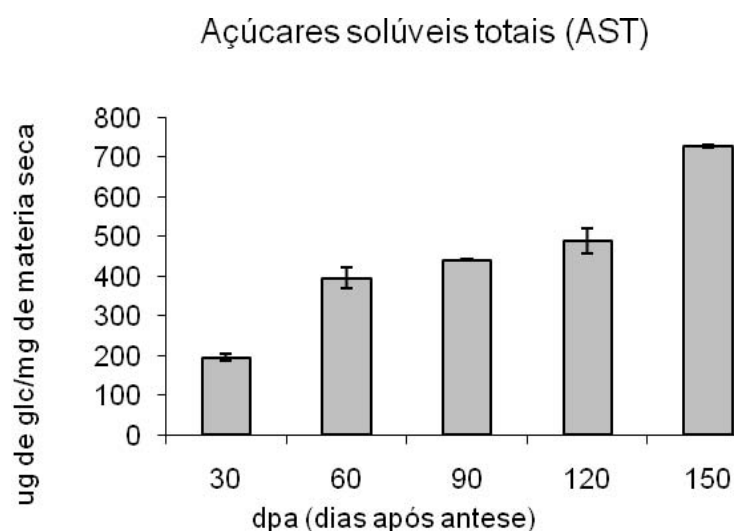


Figura 9. Teores de Açúcares solúveis totais (AST) nos diferentes estádios de desenvolvimento do fruto do mamoeiro (30-150 dpa= dias após antese). As barras representam o desvio padrão da média.

Ao observarmos os teores de AST (figura 9) fica claro o aumento progressivo destes açúcares em relação às fases de desenvolvimento do fruto. Neste caso, o fruto apresenta características compatíveis com a preparação para o amadurecimento, sendo que o aumento na concentração de açúcares parece estar relacionado aos vários eventos fisiológicos que culminam com um fruto palatável.

Paiva (2008), em estudos com mamão nos estádios “de vez” e “maduro”, mostrou que há um aumento do teor de sólidos solúveis da primeira para a última fase do fruto estudada pelo autor.

Morais *et al.* (2007) em estudos com o híbrido UENF/Caliman 01 no estágio de colheita (aproximadamente 120 dpa) observaram que existe um pequeno acréscimo nos teores de sólidos solúveis e de açúcares solúveis totais ao longo do armazenamento do fruto. Entretanto, as mudanças nos teores de açúcares solúveis totais não foram estatisticamente significativas.

No sentido de esclarecer esses dados, os extratos alcoólicos foram analisados em HPLC, tendo como resultado a quantificação de cada um dos açúcares, sendo eles: sacarose, frutose e glucose (figura 10).

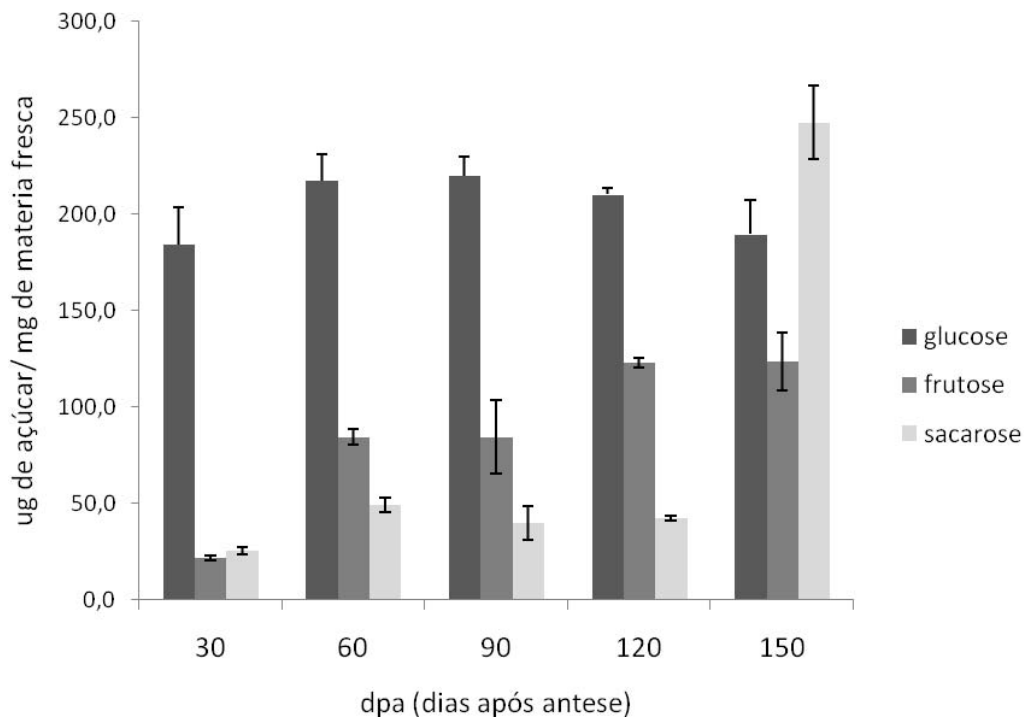


Figura 10. Teores de glucose , frutose e sacarose, nos diferentes estádios de desenvolvimento do fruto do mamoeiro (30-150 dpa=dias após antese). As barras representam o desvio padrão.

A partir dos dados da figura 10, observa-se que nos diferentes estádios do desenvolvimento a glucose se mantém com quantidade alta e constante. Já a frutose possui tendência de aumento até os 120 dpa e se mantém nos estádios posteriores. No caso da sacarose, observa-se aumento nos primeiros estádios (30-60 dpa) e aos 60-120 dpa, não há variação significativa. Entretanto aos 150 dpa a quantidade desse açúcar é aproximadamente seis vezes maior que nos outros estádios. Há, portanto,

um aumento da relação sacarose: monossacarídeos, o que denota uma transição fonte-dreno. A partir deste estágio, o fruto parece não ser mais um drenó para planta mãe, pois o mesmo inicia o armazenamento de sacarose como sua reserva energética, além de utilizar o açúcar como um atrativo à dispersão de suas sementes (Paiva, 2008). Com base nestes argumentos podemos inferir que a atividade de invertase deve diminuir e em contrapartida há o aumento da atividade de sacarose sintase (Susy). Gomez *et al.* (1999) em estudos com armazenamento de frutos do mamoeiro após a colheita, observam que a atividade da Susy foi maior aos 5 dias após a colheita, que é o período coincidente com a hidrólise da sacarose, no pico respiratório.

Nos estudos de Gomez *et al.* (1999), observa que os açúcares solúveis totais, contabilizados como a soma dos teores de glicose, frutose e sacarose, variaram de 9% no estágio verde a cerca de 11% no estágio maduro. Estes resultados confirmam os dados encontrados por Paull *et al.* (1999) e Chan *et al.* (1979) de que os açúcares solúveis são, em sua maior parte, acumulados quando o fruto do mamoeiro está ainda ligado à árvore, provavelmente em função da fotossíntese, o que corrobora com nossos dados, pois neste estudo os estádios analisados são de frutos em desenvolvimento, ou seja, ainda na planta mãe, sendo o estágio de 150 dpa, aproximadamente o ponto de colheita.

Durante o amadurecimento, o adoçamento pode ser devido ao acúmulo de sacarose originada da fotossíntese, ou da hidrólise de carboidratos de reserva. O mamão não possui quantidades significativas de amido que possam ser convertidas em açúcares durante o amadurecimento, existindo controvérsias sobre um possível adoçamento após a colheita (Chan *et al.* 1979; Cordenunsi & Lajolo 1995). Desta maneira os dados sugerem que

o fruto em desenvolvimento (dos 30 aos 90 dpa) funciona como um dreno e a partir deste estágio, não é mais afetado pelas relações fonte-dreno na planta.

O acúmulo de sacarose pode não estar relacionado com o desenvolvimento das sementes, uma vez que estas já se apresentam desenvolvidas, mas não completas, aos 90 dias. No entanto, há a possibilidade de que as reservas das sementes ainda estejam sendo depositadas, já que em muitos casos, se observa a semente do fruto de mamão morfológicamente completa, mas ainda sem suas reservas.

Em resumo, pode-se observar que o principal açúcar acumulado aos 150 dpa é a sacarose, sendo esta provavelmente a principal fonte energética do mamão maduro, uma vez que este não possui amido como reserva.

Quanto às relações entre os níveis de açúcares e as diferentes proporções dos polissacarídeos da parede celular, pode-se sugerir que o aumento na concentração dos AR (açúcares redutores) esteja entre os principais fatores que aumentam a força de turgor celular, contribuindo com o processo de expansão celular, o qual seria também controlado pelo grau de interação molecular dos xiloglucanos, como veremos em resultados a seguir.

O balanço entre as concentrações de açúcares está intimamente relacionado com as fases fisiológicas do fruto e outro processo importante e interferente é o da degradação da parede celular, o que denota ainda mais o controle na expansão da célula.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA PAREDE CELULAR EM FRUTOS DO MAMOEIRO EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO.

Para a análise destes resultados é importante salientar que o fruto do mamoeiro apresenta uma curva de crescimento sigmoidal. Em estudos realizados por Calegario (1997) com frutos do mamoeiro entre 30 e 180 dpa, foi observada uma fase exponencial de crescimento até em torno de 110 dpa, sendo que após esta data seguiu-se uma fase de estabilidade, sem mudanças aparentes nas dimensões do fruto.

A Figura 11 apresenta dados de rendimento das frações oxalato de amônio a 0,5%, 0,1 M, 1M, 4M de NaOH e resíduo (celulose) de extrações da parede celular de frutos coletados no período entre 30 e 150 dpa.

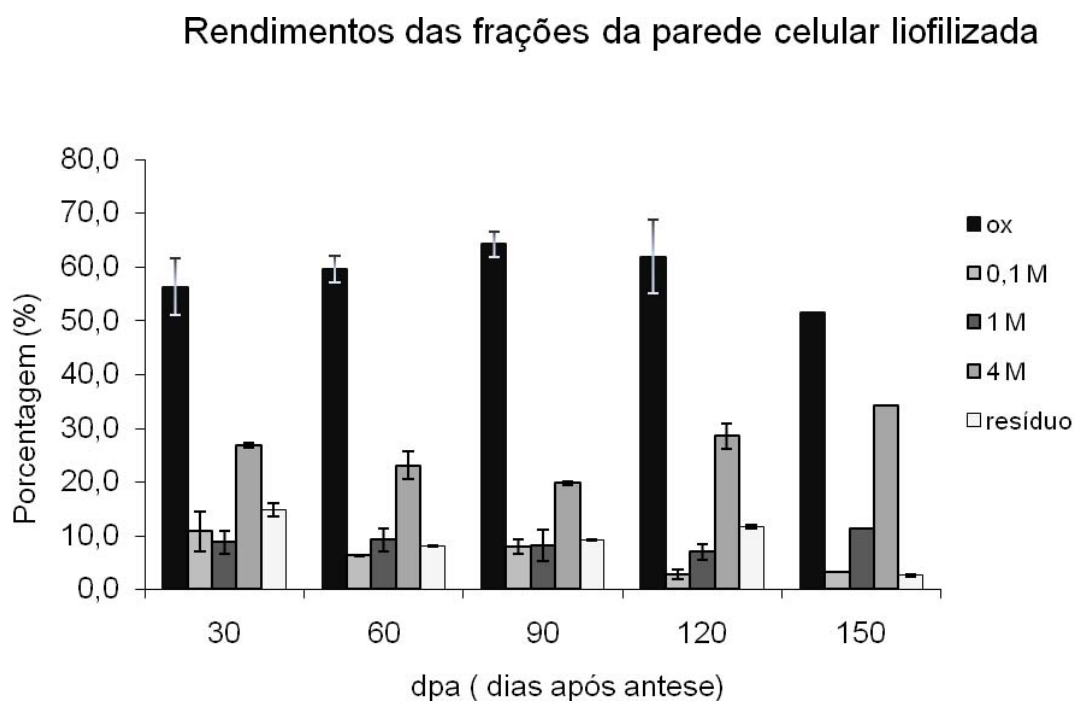


Figura 11. Porcentagem das frações da extração dos polímeros de parede celular, nos diferentes estádios de desenvolvimento do fruto do mamoeiro (dpa= dias após antese). Oxalato de amônio (OX) e 0,1M de NaOH (pectinas), 1 e 4M de NaOH (hemiceluloses) fracamente e fortemente ligadas à celulose respectivamente, e resíduo sendo considerado celulose. As barras representam o desvio padrão.

Na figura 11, pode-se observar que a fração oxalato (pectinas) possui tendência de aumento até os 90 dpa e uma posterior queda em 150 dpa, mas de maneira geral esta fração mantém-se constante ao longo dos estádios de desenvolvimento estudados. A fração 0,1M de NaOH, é considerada uma mistura de pectinas e hemicelulose fracamente ligadas à celulose. Esta fração foi utilizada para fazer uma melhor limpeza no material, sendo assim ela é desconsiderada em nossa discussão. Com relação à fração 1M de NaOH (hemiceluloses fracamente ligadas à celulose), pode-se observar constância no rendimento, sendo possivelmente hemiceluloses mais solúveis (em degradação) e menos agregadas à celulose. Já com a fração 4M de NaOH é encontrado grande porcentagem inicial (30 dpa), que tende a diminuir em 60 e 90 dpa e aumenta novamente em 120 dpa. É interessante observar que no resíduo acontece a mesma tendência da fração 4M de NaOH, porém podemos observar que nos estádios finais de desenvolvimento do fruto é quase nula sua presença. Já as pectinas possuem tendência contrária à observada nas frações de hemicelulose e celulose. Em 120 dpa pode ser visto um comportamento diferencial das proporções dos polímeros estudados e uma queda brusca do resíduo em 150 dpa.

Calegario (1997) observando aspectos de dimensões do fruto, afirma que até 120 dpa formam-se cerca de 50% da matéria seca do fruto inteiro, a qual é constituída na sua maior parte pela polpa. Nesta fase (120 dpa) o acúmulo de matéria seca parece estar relacionado com o aumento no volume da parede celular.

Este aumento decorre principalmente da expansão de células do parênquima do fruto (Roth & Clausnitzer 1972). Seria então o estágio de 120

dpa, uma transição entre a maturidade fisiológica e o início do amadurecimento, como visto por Calegario (1997).

Os dados de porcentagens dos polímeros de parede celular citados acima mostram que as modificações devem ocorrer nos polímeros de hemiceluloses e pectinas durante o desenvolvimento do fruto. Aqui formula-se a hipótese de que modificações estruturais, como ramificações e despolimerizações, poderiam refletir situações de mudanças de fases fisiológicas durante o desenvolvimento do fruto do mamão. Para testar essa hipótese, foram realizados estudos da composição (análise de monossacarídeos) destes polímeros.

Na Tabela 1 podem ser observadas as porcentagens dos monossacarídeos neutros analisados, na fração Oxalato de Amônio a 0,5 %.

Tabela. 1 Porcentagem dos monossacarídeos na fração Oxalato de amônio 0,5% (pectinas) nas diferentes fases do desenvolvimento do fruto (dpa = dias após antese), significando: fuc- fucose, ara- arabinose, rha-ramnose, gal-galactose, glc-glucose, xil-xilose e man-manose.

Fração Oxalato de amônio							
Monossacarídeos %							
dpa	fuc	ara	rha	gal	glc	xil	man
30	0,83	11,63	6,89	69,06	7,51	2,06	2,02
60	0,83	9,56	7,21	71,67	4,78	3,50	2,45
90	0,69	7,64	5,79	59,89	19,95	3,14	2,89
120	0,83	8,67	5,97	71,32	8,78	4,43	0,00
150	0,77	8,98	8,34	66,38	9,33	4,05	2,15

Observa-se na tabela 1 que no decorrer da maturação do fruto, há aumento de glucose o que é visto até 90dpa, e posterior queda em 120 dpa aumentando novamente sua porcentagem em 150 dpa.

No caso dos outros monossacarídeos não houve diferenças entre as porcentagens encontradas e as diferentes fases de desenvolvimento estudadas, porém em 120 dpa a manose não foi detectada. Como retratado por Ali *et al.* (2004); Manrique *et al.* (2004) , Paull *et al.* (1999) a pectina do mamão possivelmente é um rhamnogalacturonano, o que é confirmado com os nossos resultados.

Alterações nas pectinas têm sido vistas como uma característica do amadurecimento do fruto de mamão (Paull *et al.*,1999), porém isso parece não ter uma relação direta com o amolecimento da polpa (Zhao *et al.*, 1996).

Lazan *et al.* (1995) com estudos em mamão pós-colheita, observaram que as atividades das poligacturonases (PG) e das pectinametilesterases (PME) aumentam continuamente conforme há solubilização das pectinas. No entanto, houve um aumento da atividade da β -galactosidase, coincidindo com a queda de firmeza acelerada do fruto e com as mudanças significativas dos polissacarídeos da parede celular. Com base nesses dados, os autores sugerem que a despolimerização e a solubilidade das pectinas seriam processos independentes. Os estudos de Paull *et al.* (1999) com mamão, sugerem que a pectina da lamela média foi melhor extraída durante o processo de amadurecimento. Isto também foi visto por Glenn *et al.* (1988), em estudos com maçãs, sendo que a queda na coesão celular correspondia à maior solubilidade da parede celular. No entanto, não temos evidências de que algo similar ocorra durante o desenvolvimento do fruto. Por outro lado, estudos recentes realizados por Paiva (2008) mostra que nos estádios iniciais

do amadurecimento (120 dpa) o grau de metil-esterificação é maior do que no estágio de consumo, onde esse grau reduz de 66% para 43%.

A tabela 2 apresenta as análises de monossacarídeos da fração 1M, podendo ser observado que nos estádios de 90, 120 e 150 dpa os monossacarídeos possuem as maiores diferenças em porcentagem. Com relação à galactose existe uma tendência de queda no estágio final de maturação (150 dpa). Já com relação à glucose as diferenças são encontradas em duas determinadas fases, no intervalo entre 30 e 60 dpa onde ocorre um aumento desse monossacarídeo e posterior queda em 90 dpa, fechando os estádios de maturação (150 dpa) com alta porcentagem deste monossacarídeo. Ao observarmos as porcentagens de xilose podemos dizer que o açúcar é encontrado em maior porcentagem em 90 dpa e menor porcentagem em 150 dpa, o que pode ser explicado pela degradação e “recodificação” do xiloglucano, o que será salientado no decorrer do trabalho.

Tabela 2. Porcentagem dos monossacarídeos na fração 1M de NaOH (hemiceluloses fracamente ligada à celulose) nas diferentes fases do desenvolvimento do fruto (dpa = dias após antese), significando: fuc- fucose, ara- arabinose, rha-ramnose, gal-galactose, glc-glucose, xil-xilose e man-manose.

Fração 1M de NaOH							
Monossacarídeos %							
Dpa	fuc	ara	rha	gal	glc	xil	man
30	0,80	2,07	1,14	23,48	36,47	29,09	6,94
60	0,86	1,43	0,95	19,11	41,20	29,98	6,46
90	1,16	1,33	0,77	16,16	31,48	43,09	6,00
120	0,79	1,78	0,89	19,01	44,23	28,92	4,38
150	0,89	1,06	1,09	14,18	59,81	17,50	6,36

Na tabela 3 estão representados os dados da fração 4M de NaOH pode ser observado o aumento de glucose em 150 dpa e queda em xilose e manose neste mesmo sentido. É importante lembrar neste instante que os açúcares solúveis totais já haviam sido extraídos, portanto essas expressivas quedas dos monossacarídeos refletem realmente modificações dos polímeros em estudo.

Tabela 3. Porcentagem dos monossacarídeos na fração 4M de NaOH (hemiceluloses fortemente ligada à celulose) nas diferentes fases do desenvolvimento do fruto (dpa = dias após antese), significando: fuc- fucose, ara- arabinose, rha-ramnose, gal-galactose, glc-glucose, xil-xilose e man-manose.

Fração 4M de NaOH							
Monossacarídeos %							
dpa	fuc	ara	rha	gal	Glc	xil	man
30	1,66	0,85	0,63	19,66	50,68	13,34	13,19
60	1,42	1,04	0,77	18,88	50,54	11,67	15,67
90	1,50	0,95	0,95	20,09	53,12	10,97	12,42
120	1,09	0,69	0,92	18,29	60,82	7,39	10,80
150	0,98	0,66	1,19	15,09	66,57	7,68	7,82

Foi também realizada a análise dos monossacarídeos presentes nos resíduos de parede celular de frutos com 30 e 150 dpa (figura 12) o que revelou a presença de proporções razoáveis de galactose, além da presença de glucose, o que era esperado, sendo a glucose o monossacarídeo da celulose. No caso do resíduo de 30 dias, há também ramnose. Estes dados sugerem que os polímeros pécticos podem realmente estar associados à celulose.

Como o método utilizado normalmente extrai as pectinas nos primeiros passos da extração (oxalato e 0,1M de NaOH), a presença de pectina no resíduo poderia indicar que polímeros pécticos podem se associar fortemente à celulose como um artefato do processo de extração.

Alternativamente é possível também que existam situações em que ligações covalentes entre polímeros pécticos e celulose ocorram. No entanto, para provar tal hipótese, análises químicas mais profundas e específicas teriam que ser efetuadas.

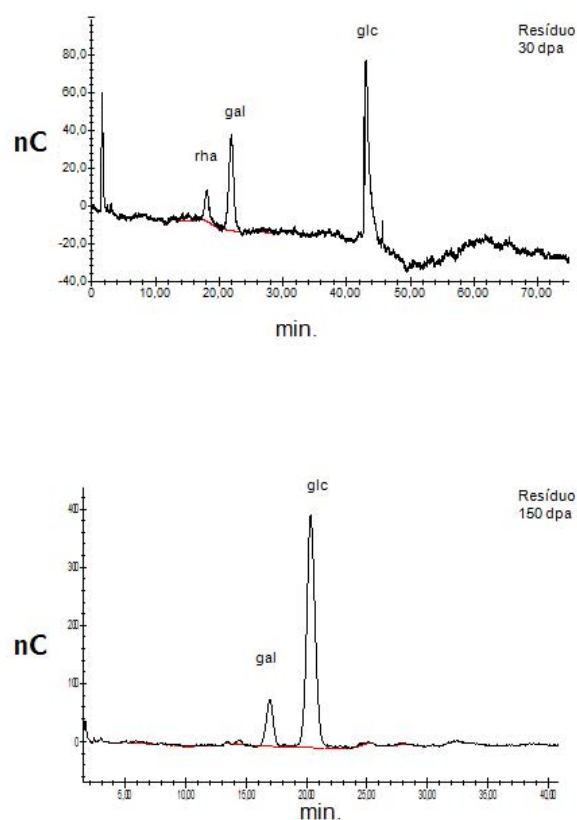


Figura 12.

Cromatogramas representativos dos monossacarídeos do resíduo após extração com 4M de NaOH analisados em HPAEC/ PAD- Dionex 500. Em cada cromatograma na posição superior à direita estão os estádios do fruto, sendo os açúcares: rha-ramnose, gal-galactose e glc-glucose.

Ao analisar em conjunto os dados das análises de monossacarídeos da parede celular nos estádios entre 90-120 dpa (tabelas 1, 2 e 3), observa-se que existe um aumento de glucose, galactose e xilose e uma redução na

quantidade de manose, sugerindo a síntese de xiloglucano e ou galactomanano. Isto pode significar que a parede celular sofre modificações em sua composição, o que leva à preparação dos frutos para degradação nos estádios posteriores. De fato, a redução da firmeza na polpa do fruto é significativa após os 140 dpa como mostram os dados de Calegario (1997).

O conjunto de dados quantitativos e qualitativos sugere que há uma modificação importante na parede celular entre os 90 e os 120 dpa. Enquanto há alteração nas pectinas, com uma diminuição em sua proporção e modificação nas ramificações dos ramnogalacturonanos com galactanos, alterações importantes no domínio celulose-hemicelulose também ocorrem. Há diminuição acentuada na proporção de celulose na parede aos 90 dpa. Foram detectadas alterações nos monossacarídeos glucose, xilose e galactose nas frações de hemiceluloses (NaOH 1 e 4M), que são compatíveis com alterações no xiloglucano. Para avaliar melhor estas alterações, foram realizados experimentos com análises por degradação enzimática do xiloglucano, de forma a compreender se a composição em oligossacarídeos responderia às alterações na estrutura fina (constituição) da parede durante o desenvolvimento do fruto do mamoeiro.

4.3 OLIGOSSACARÍDEOS (OXG) NOS DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DO FRUTO

Para a identificação dos OXG de xiloglucano do fruto do mamoeiro, foi utilizado um padrão de maçã, já descrito na literatura por Vincken, *et al* (1996). Os OXG de maçã foram obtidos através da extração do xiloglucano e o mesmo foi submetido à digestão com celulase (Figura 13), tornando-se o padrão de OXG.

A figura 14 mostra os resultados de coinjeção dos OXG de mamão com os OXG de maçã (50% v/v) em HPAEC-Dionex. Os dados mostram que o xiloglucano em frutos do mamoeiro é similar ao de fruto da macieira. Portanto, os oligossacarídeos presentes no xiloglucano de mamão foram identificados com base nos tempos de retenção dos de maçã.

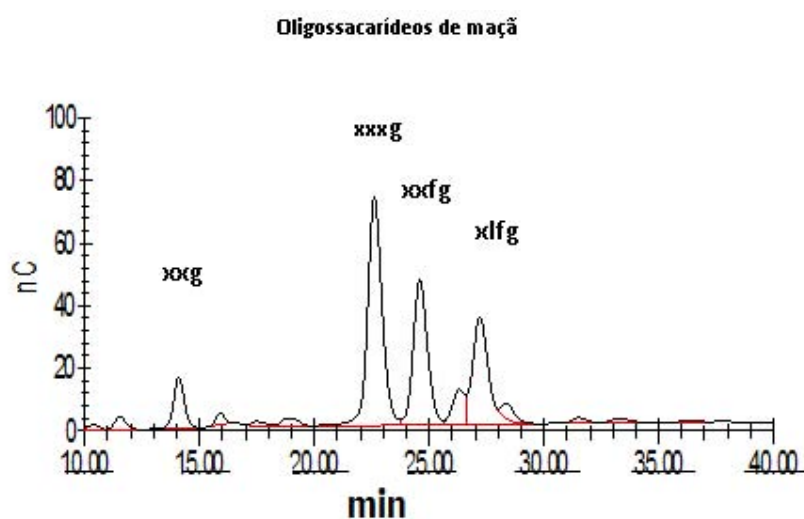


Figura 13. Perfil cromatográfico dos oligossacarídeos obtidos após hidrólise do polissacarídeo (xiloglucano) presentes na polpa de maçã, gerados por ação de celulase de *Trichoderma sp.* (Megazyme). Glucose= g, OXG de glucose com ramificações de xilose= X, trissacarídeo glc-xil-gal= L e fucose= F.

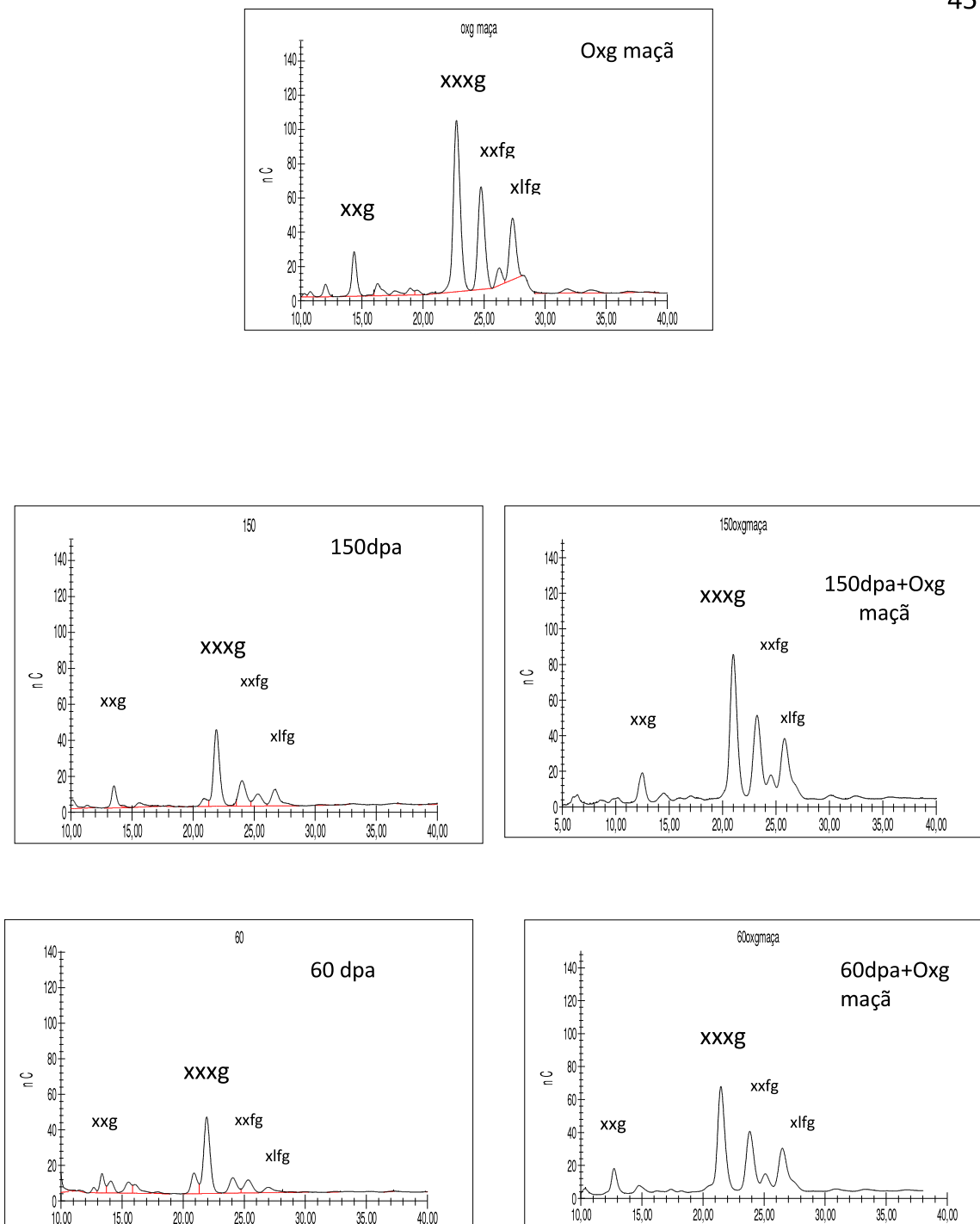


Figura 14. Perfil cromatográfico dos oligossacarídeos obtidos após hidrólise dos polissacarídeos presentes na fração NaOH 4M obtida a partir de frutos do mamoeiro em estádios de maturação do fruto (60 e 150 dpa=dias após antese) e oligossacarídeos de maçã, gerados por ação de celulase de *Trichoderma sp.* (Megazyme). Além a coinjeção dos mesmos. Glucose= g, OXG de glucose com ramificações de xilose= X, trissacarídeo glc-xil-gal= L e fucose= F.

Com o padrão definido são observados resultados e a identificação pode ser confirmada, como mostra a tabela 4, o OXG (XLXG), foi identificado comparado ao padrão de jatobá, padrão esse já definido por nosso grupo de pesquisa.

Tabela 4. Porcentagem das áreas dos picos identificados como oligossacarídeos em comparação com OXG de maçã.

OXG (%)	dpa (dias após antese)				
	30	60	90	120	150
XXG	27,1	15,1	17,4	2,8	6,1
XXXG	47,8	54,2	56,7	13,1	52,1
XXFG	10,0	13,1	16,9	41,9	19,8
XLXG	10,0	12,4	7,5	27,9	11,3
XLFG	5,1	5,1	1,5	14,3	10,7

Na tabela 4 encontram-se alterações significativas nos padrões de oligossacarídeos ao longo do desenvolvimento do fruto. Para melhor análise dos dados é importante retomar a nomenclatura dos OXG.

As glucoses não ramificadas na cadeia principal do xiloglucano são denominadas G, enquanto os pontos da cadeia principal ramificados por xilose são denominados X e quando há ramificação com galactose, o trissacarídeo glucose-xilose-galactose é denominado L e a ramificação com fucose α -(1,6) o tetrassacarídeo é denominado F.

De maneira geral, oligossacarídeos com menor tempo de retenção (possivelmente de menor peso molecular e menos ramificados) diminuíram drasticamente aos 120 dpa, enquanto que os de maior peso molecular e/ou grau de ramificação aumentaram proporcionalmente. Paralelamente, observou-se um aumento relativo nos oligossacarídeos fucosilados (XXFG e XLFG). Aos 120 dpa, houve uma queda forte e reversível em XXG e XXXG e estas alterações foram precedidas por uma queda, também reversível em XLXG aos 90 dpa. Estes resultados denotam a existência de alterações

significativas na estrutura fina do xiloglucano presente na polpa dos frutos do mamoeiro durante a maturação. Tais alterações podem significar tanto modificações nos polímeros presentes na parede, como também ser o reflexo de deposição e degradação de polímeros existentes. Nossos experimentos não permitem saber qual desses processos predomina durante o desenvolvimento do fruto.

Como já descrito, investigação dos OXG gerados auxilia o entendimento de quais processos ocorrem durante a montagem e da expansão da parede primária. Processos esses auxiliados pela conformação, dinâmica e interação dos polissacarídeos durante estes processos, pois são provavelmente fundamentais para as alterações de textura do mamão. As análises utilizadas não nos permitiu ao certo o detalhamento da estrutura fina do polímero e nem sua conformidade espacial, pois não foram analisados os aspectos topológicos das alterações do xiloglucano durante o desenvolvimento dos frutos do mamoeiro. Desta forma, podemos apenas inferir quais efeitos estas interações teriam de forma geral na parede.

O aumento na proporção de oligossacarídeos fucosilados pode ser resultado de degradação de moléculas de xiloglucano menos fucosiladas ou da deposição de novo xiloglucano com esta composição. O significado deste aumento gradativo na fucosilação pode estar relacionado à alteração do domínio celulose-hemicelulose. À medida em que a celulose é degradada, o xiloglucano mais fucosilado apresenta maior interação entre si, formando aglomerados contendo mais XXFG e XLFG. Em relação à diminuição em XXG e XXXG a situação é inversa. Estes oligossacarídeos também caracterizam regiões da molécula de xiloglucano que interagem fortemente com a celulose, mas durante a maturação tenderam a desaparecer da parede. Estas alterações podem ser consequência da retirada da celulose da parede. Já a

queda em XLFG aos 90 dpa é clara, mas é certamente uma marca importante das alterações que o fruto sofre no que concerne à sua textura. Algumas comparações com dados obtidos por outros autores podem ser instrutivas na interpretação desses resultados.

Quando o xiloglucano adota uma conformação de baixa energia isso permite que seus resíduos ramificados virem-se para um único lado (estrutural e espacial) da molécula. Sendo assim a outra face da molécula fica livre para interações com a celulose. Levy *et al.*, (1991) sugeriram, através de simulações computacionais, que os aspectos estruturais do xiloglucano relacionados à ramificação fucosilada deste polímero seriam de grande importância para a forma de interação com a celulose. Os dados de modelagem sugerem que os resíduos de fucose sejam responsáveis por tornar a molécula mais linear, enquanto que os oligossacarídeos não-fucosilados seriam mais retorcidos. Essa complexa interação xiloglucano-celulose também é responsável pela resistência ao turgor e pelo crescimento anisotrópico das células vegetais.

Com base nos dados obtidos no presente trabalho pode-se sugerir que as variações nas proporções entre os oligossacarídeos de xiloglucano encontrados nos polímeros, mostram um período de transição com profundas alterações estruturais neste polissacarídeo. Nos estudos de Levy *et al.* (1991) e Vinchen *et al.* (1996) os autores afirmam que a fucosilação do xiloglucano modela as modificações que o polímero sofrerá. Vinchen *et al.* (1996) em estudos com maçã verificam que o oligossacarídeo XLFG é o principal responsável pela modulação na clivagem do xiloglucano. Com base nestes dados as possíveis explicações para estas variações têm que levar em consideração os seguintes fatos:

- 1) As regiões menos ramificadas (tanto com galactose ou fucose) do xiloglucano são associadas com maior interação intermolecular com o próprio xiloglucano e com a celulose;
- 2) O aumento isolado de fucosilação é um indicativo de que o xiloglucano torna-se mais interativo, tanto entre si como com a celulose

Isto posto, pode-se sugerir que no início desenvolvimento o menor nível de fucosilação confere à parede maior liberdade para a expansão. Isso ocorre paulatinamente ao longo de todo o período de desenvolvimento do fruto. Porém, há um período de transição em que o xiloglucano sofre uma transformação significativa, que é a diminuição nos fragmentos pouco ramificados (XXG e XXXG) e aumento de fucosilação (XXFG). Isto indica que o xiloglucano na parede torna-se menos interativo entre si mesmo e com a celulose. Aos 150 dpa a estrutura fina do xiloglucano volta a ser similar ao que corresponde aos 30 dpa, ou seja, torna-se novamente acessível à hidrólise.

Uma observação importante sobre os xiloglucanos e a interação com a celulose foi feita por Lima *et al.* (2004). Estes autores demonstraram que o peso molecular do xiloglucano é fundamental na interação, sendo mais interativos os de menor peso molecular. No presente trabalho com a parede celular de mamão, não foi medido o peso molecular do xiloglucano, mas este pode ser um fator importante a ser considerado no futuro e que pode ter influenciado os resultados.

4.4 SECÇÕES HISTOLÓGICAS DO MESOCARPO EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DO FRUTO

No presente trabalho foi agregado o estudo histológico de mais um estágio do fruto (5 dpa), para que pudéssemos ter um parâmetro de células

ainda muito pequenas e possivelmente em divisão (como citado no item 3.4).

Com a análise dos dados pode-se observar que as maiores diferenças em relação à expansão celular dão-se entre 30 e 90 dpa. A expansão celular do mesocarpo foi da ordem de 3 vezes, encontrado dos 5 aos 150 dpa. Entretanto o aumento principal (2X) ocorreu entre 5 e 120 dpa, o que pode ser observado na Figura 15. Segundo Coombe (1976) *apud* Berilli *et al.* (2006), o volume final do fruto está ligado a três fatores: número, densidade e volume das células dos tecidos desse órgão. Dentre estes, o volume das células é o fator mais influenciado pelas condições de cultivo, ou seja, pela disponibilidade de água e nutrientes, assim como condições de temperatura e umidade relativa do ar.

Observa-se ainda (Figura 15) que os períodos de expansão ocorreram entre 5 e 30 dpa e entre 60 e 90 dpa. Este último período coincide com algumas alterações observadas na parede celular como um aumento de 4 vezes na proporção de glucose na fração oxalato (tabela 1). Nestes estádios citados, também é observada uma redução repentina em XLXG e XLFG seguida por um aumento nas proporções de oligossacarídeos fucosilados (tabela 4). Além disso, a partir dos 60 dpa, teve início uma diminuição gradativa dos teores de manose nas frações 1M (tabela 2) 4M (tabela 3) da parede, sendo esta última, principalmente, correspondente às hemiceluloses mais fortemente ligadas à celulose. As possíveis explicações para estas alterações estruturais na parede, correlacionadas temporalmente ao aumento na expansão celular poderiam ocorrer a partir de 60 dpa, quando a parede começa a se modificar com a degradação da celulose e dos mananos. Para que a degradação da parede ocorra, as modificações nos xiloglucanos têm que ocorrer rapidamente (entre os 60 e os 90 dpa), de forma que nestes

estádios as enzimas de hidrólise tenham acesso aos componentes da parede que precisam ser degradados, ou seja, para se tornarem “códigos” dos pontos de degradação da parede celular, o que auxilia no processo de amaciamento do fruto.

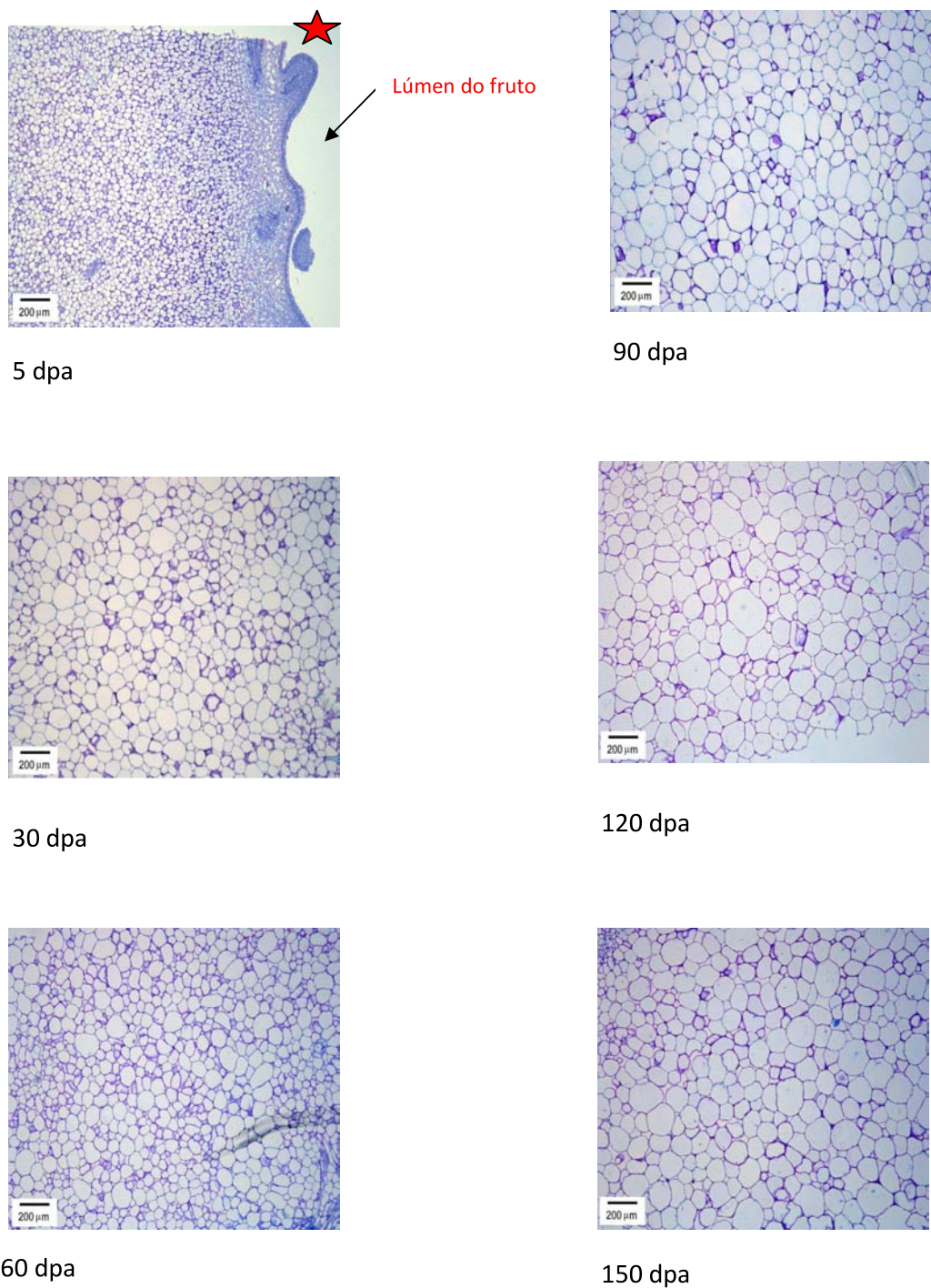


Figura 15. Cortes transversais da polpa do mamão de 5-150 dpa ilustrando a diferença do tamanho das células. Coloração em azul de astra e safranina, a 1% e na proporção 9:1 (v/v), e montadas em resina Permouint, objetiva de 5x. A estrela vermelha está indicando a formação de uma semente.

A Figura 16 apresenta os dados do tamanho das células. Através da análise estatística podemos observar que o ponto 150dpa é um estágio discrepante, se considerado o tamanho das células. Neste caso foi necessária a retirada do estágio de 150 dpa para que as diferenças fossem salientadas.

Através da Anova e Tukey observou-se que há diferença significativa nos tamanhos das células nos diferentes estágios de maturação do fruto, sendo que em 150dpa essa diferença é clara.

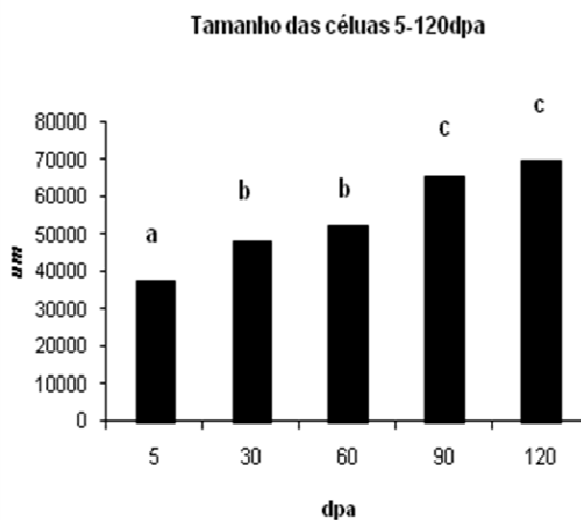


Figura 16. Tamanho das células nos diferentes estágios de desenvolvimento dos frutos do mamoeiro. Letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

A partir destes dados pode-se concluir que o estágio de divisão das células precede aos estágios de desenvolvimento estudados e que realmente entre 30-150 dpa ocorre a expansão das células.

Com os dados obtidos foi possível sugerir a ocorrência de dois estádios que marcam o desenvolvimento dos frutos do mamoeiro até o estágio em que este torna-se pronto para a comercialização. O primeiro pulso de expansão se dá nos primeiros estádios (5 e 30 dpa), onde as células sofrem divisão e um surto de expansão inicial. Segue-se um período de relativa estabilidade no fruto até que, entre os 60 e 90 dpa ocorreu um novo surto de expansão celular, acompanhado de alterações significativas na parede celular, principalmente no mesocarpo, como observado com os dados de rendimento da parede celular entre outros. O xiloglucano modificado e, a partir desse ponto a celulose e o manano começaram a ser degradados até que, ao final do processo, muito pouco dessas duas hemiceluloses restaram no fruto. No entanto, o teor e a composição das pectinas parecem se manter relativamente constantes. Como resultado, ao mesmo tempo em que o fruto se “enche” de sacarose, a parede se altera profundamente, e possivelmente levando às futuras alterações que auxiliam na modificação de textura do fruto.

Para aprofundar ainda mais este modelo, as atividades de algumas das enzimas relacionadas às transformações observadas nas paredes celulares do fruto do mamoeiro foram acompanhadas ao longo do desenvolvimento do fruto.

4.5 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS NOS DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DO FRUTO

As atividades enzimáticas avaliadas neste estudo foram as das respectivas hidrolases: β -galactosidase e (EPG) Endopoligalacturonase (enzimas relacionadas às pectinas), α -galactosidase (relacionada ao galactomanano) e a β -glucosidase (relacionada ao xiloglucano).

A seleção das enzimas para os ensaios teve como principal objetivo a análise das alterações em hemiceluloses. Isto porque nestes polímeros foram encontradas modificações consideráveis, como visto nos resultados de caracterização da parede celular e oligossacarídeos, além de ter havido despolimerização total das pectinas nas fases de desenvolvimento aqui estudadas.

Estudos de Paull & Chen (1983); Lazan *et al.* (1995); Paull *et al.* (1999); Manrique *et al.* (2004) e Ali *et al.* (2004) demonstraram que a degradação das hemiceluloses é provavelmente a maior responsável pelo amolecimento da polpa do fruto do mamoeiro. Ali *et al.* (2004) em estudos de comparação de diversas enzimas relacionadas ao amolecimento de frutas tropicais, verificou que para *Carica papaya* a PME, β -glucanase e, em especial a β -galactosidase correlacionam-se com variações de textura do fruto no amadurecimento.

A Figura 17 apresenta a atividade da EPG, onde pode-se observar a tendência de aumento de mais que o dobro, no intervalo de 30-150 dpa. Foi observado também que a atividade máxima da EPG encontra-se em 150 dpa (estádio inicial de amadurecimento), como é salientado por Calegário (1997). Atividade da EPG (figura 17) demonstra que nos estádios em estudo, a pectina sofre transformações estruturais, porém é possível que estas transformações não confirmam maciez a polpa do fruto. Como observado por Giovannoni *et al.* (2001) através de genes isolados de PG, que a mesma não possui atividade suficiente para dar maciez ao fruto de tomate, já a β -glucanase tem se mostrado com expressão diferencial.

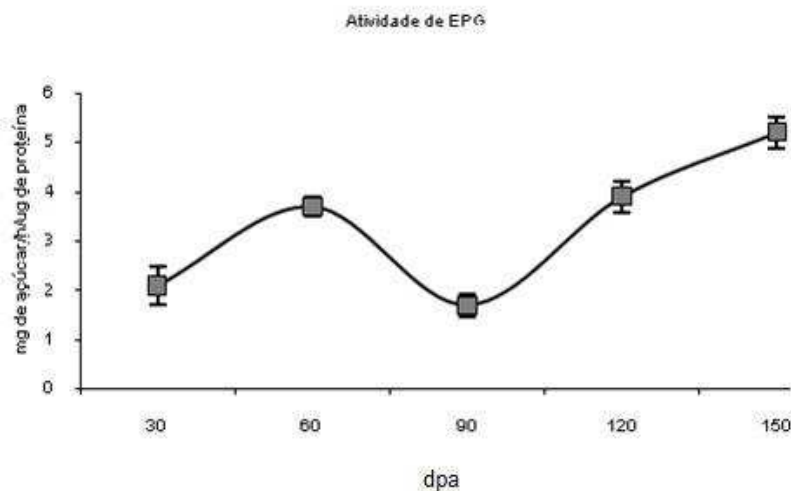


Figura 17. Atividade da EPG (endo-poligalacturonase) em diferentes estádios de desenvolvimento do fruto (dpa= dias após antese). As barras representam o desvio padrão.

Paull *et al.*, (1999) em estudos com mamão, sugerem que a degradação das pectinas na lamela média é mais eficiente durante o processo de amadurecimento, o que também pode estar ocorrendo nos diferentes estádios do desenvolvimento como visto neste estudo, porém em menor proporção. A degradação das pectinas também foi relatada por Glenn *et al.*, (1988), em estudos com maçã, onde observam que na fase de amadurecimento a queda na coesão celular correspondia à maior solubilidade da parede celular.

Paull & Chen (1983) observaram que o aumento da atividade da PME não auxilia no amolecimento da polpa do fruto. A desmetilação das pectinas por ação da PG é sim a maior responsável pela mudança no tamanho dos polímeros de pectinas, dados que Ali *et al.* (2004) e Paiva (2008) confirmam.

Através de nossos dados e compilação dos dados em literatura, podemos inferir que uma “edição” ou “remodelamento” das pectinas ocorre provavelmente durante todo o processo de desenvolvimento (30-150 dpa). Através da Figura 18 observa-se uma redução de atividade no estágio de 90 dpa, seguida por uma retomada da atividade até os 150 dpa, o que corrobora a hipótese de “edição”.

Nas Figuras 18 e 19 observam-se as atividades das β -galactosidase e β -glucosidase. As duas enzimas apresentaram picos de atividade aos 120 dpa. A β -galactosidase possui gradativo aumento de sua atividade entre 30- 120 dpa enquanto a β -glucosidase possui pouca atividade até os 90 dpa o que reverte aos 120 dpa, atingindo sua atividade máxima, com posterior queda em 150 dpa.

Os resultados da alta atividade de β -galactosidase em 120 dpa podem ser comparados com a redução de galactose encontrada nas frações das extrações a 1M, como vista na tabela 2, sendo que esta enzima pode remover galactoses ligadas β -1,2 em OXG. De fato, na tabela 4 observou-se uma queda de XLXG, corroborando a hipótese de que a atividade desta enzima esteja relacionada com as alterações no xiloglucano aos 120 dpa.

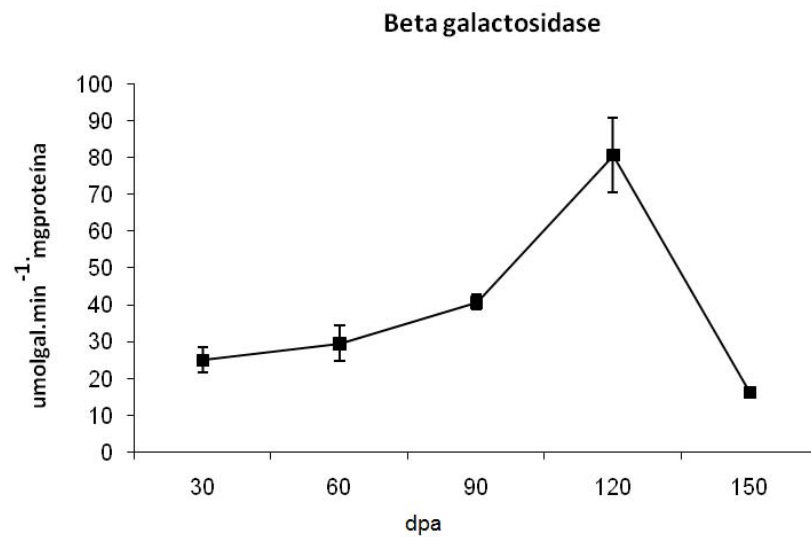


Figura 18. Atividade de β -galactosidase em diferentes estádios de desenvolvimento do fruto, sendo dpa=dias após a antese. As barras representam o desvio padrão.

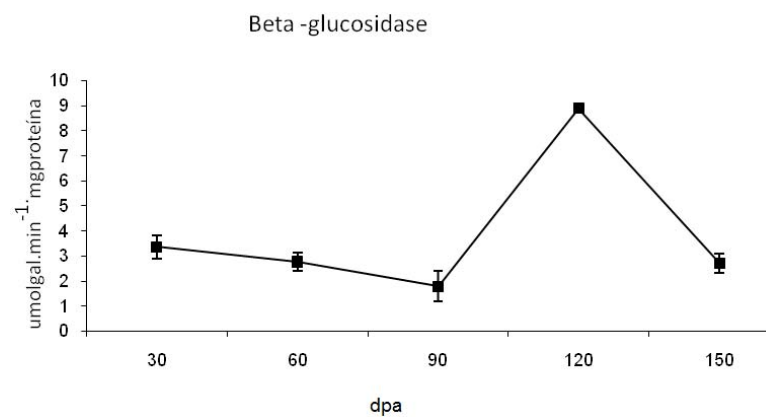


Figura 19. Atividade de β -glucosidase em diferentes estádios de desenvolvimento do fruto, sendo dpa=dias após a antese. As barras representam o desvio padrão.

As enzimas citadas acima apresentaram máximos de atividade aos 90 e 120 dpa, estádios traduzidos como início da maturidade fisiológica do fruto em estudo, pois a partir destes estádios o fruto entra na fase do amadurecimento.

Ali *et al.* (2004) analisando as β -galactosidase e β -glucosidase em dois estádios de desenvolvimento do fruto do mamoeiro (fruto verde e fruto maduro) mostraram que em frutos verdes a atividade de β -glucosidase não se altera em relação aos maduros. O aumento da atividade da β -galactosidase coincide com a diminuição de firmeza acelerada do fruto e com as mudanças significativas dos polissacarídeos da parede celular, o que corrobora com nossos estudos.

Na Figura 20 observa-se a atividade enzimática da α -galactosidase em diferentes pHs, sendo em pH 5,5 a atividade das isoformas 1 e em pH 3,0 das isoformas 2 e 3.

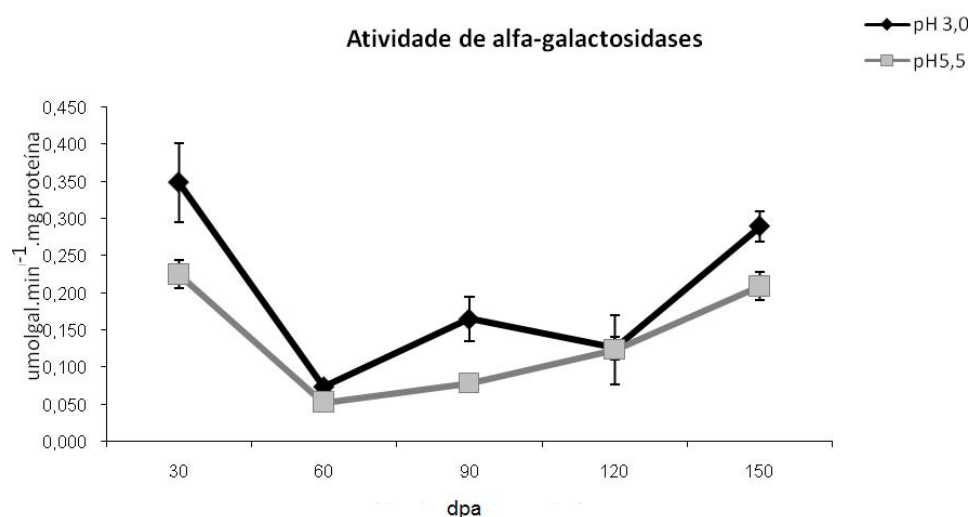


Figura 20. Atividade da α -galactosidase em diferentes estádios de desenvolvimento do fruto, sendo dpa=dias após a antese. Atividades mensuradas em tampão acetato de Na a pH 3,0 e pH 5,5. Sendo considerado α -galactosidase (1) em pH ótimo de 5,5 e α -galactosidase(2 e 3) em pH ótimo de 3,0. As barras representam o desvio padrão.

Nos dois pHs a tendência das atividades foi a mesma, alta no início, em 30 dpa, com diminuição em 60 dpa, voltando a um leve aumento em 90 dpa. A maior atividade encontrada foi aos 150 dpa, o que difere das outras enzimas analisadas. Os resultados das atividades das isoformas de α -galactosidase mostram que as duas isoformas apresentaram a maior atividade, no primeiro estágio de desenvolvimento do fruto (30 dpa), com posterior queda em 60 dpa. As duas isoformas possuem tendência de aumento de atividade ao longo dos estádios do fruto, porém em pH 3,0 pode ser observada a redução de atividade apenas em 60 dpa.

Soh *et al.* (2006) afirmam que a isoforma α -gal 2 é predominante na fase de amadurecimento do fruto, possuindo alta atividade na hidrólise dos galactomamanos, modificando potencialmente a estrutura do polissacarídeo, possuindo seu papel efetivo no desenvolvimento de frutos.

A atividade da α -galactosidase em papaya também pode contribuir na quebra das ligações cruzadas entre as cadeias de celulose galactomanano atuando como hidrolase. Essa atividade é encontrada em frutos imaturos e aumenta com o amadurecimento do fruto, coincidindo com a diminuição da firmeza (Soh *et al.*, 2006).

De maneira geral, pode-se concluir que a parede celular das células em crescimento sofre constantes modificações ao longo do processo de desenvolvimento dos frutos do mamoeiro. Conforme as células sofrem divisões em meio ao tecido, uma das principais hemiceluloses, o xiloglucano, sofre alterações importantes sugerindo fortemente que estas transformações estejam relacionadas ao processo de expansão celular. A partir desse momento, as células totalmente expandidas, aos 150 dpa, estarão prontas para entrar na fase do amadurecimento.

5. Considerações finais

Com os resultados apresentados podemos concluir que a parede celular modifica-se durante as fases do desenvolvimento do fruto, preparando-se para “codificar” informações bioquímicas e fisiológicas necessárias para ação das hidrolases, as quais auxiliam no processo de amaciamento da polpa do fruto. Temos em resumo algumas ações e resultados:

- Balanço de açúcares nos diferentes estádios de maturação do fruto, sendo que entre 30 e 90 dpa são encontrados em maiores proporções os açúcares redutores e após essa fase começa o acúmulo de sacarose, principal açúcar de armazenamento do fruto.
- “Turnover” entre a degradação e possível síntese dos polissacarídeos em estudo, culminando na expansão celular e “afrouxamento” da parede.
- Alterações nos xiloglucanos, sendo regiões menos ramificadas deste polímero associadas à maior interação intermolecular e intracelular com o próprio xiloglucano e com a celulose. Houve um aumento de fucosilação tornando o polissacarídeo menos interativo com a celulose.
- Algumas das hidrolases possivelmente relacionadas ao metabolismo da parede apresentaram atividade compatível com as alterações observadas na composição da parede celular dos frutos do mamoeiro.
- Sinergismo das ações enzimáticas nos frutos de 120 dpa, desencadeando uma série de reações desfazendo a associação hemicelulose-celulose e posteriormente levando à retirada da

celulose, deixando expostos os polímeros de pectinas para que posteriormente seja finalizado o amaciamento do fruto.

- De forma geral, o fruto parece sofrer um processo de preparação da parede celular para atingir a maturidade fisiológica, ou seja, seu ponto de colheita, quando se torna atrativo e palatável ao seu dispersor ou consumidor. As modificações sofridas pela parede celular possibilitam a percepção mais imediata dos açúcares, pois essas modificações auxiliam no melhor acesso ao conteúdo intracelular. Com as paredes celulares menos resistentes e ao mesmo tempo com um teor maior de sacarose, as características do fruto tornam-se compatíveis com um fruto doce e macio, que é o adequado para o consumo.

6. Referências Bibliográficas

- Alberts, B.; Bray, D; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Watson, J.D. (1997). *Biologia molecular da célula*. 2 ed Artes médicas, Porto Alegre, p. 1294.
- Ali, M. Z.; Chin, H.L. & Lazan, H. (2004). A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. *Plant Science*. 167; 317-327.
- Ali, M.Z.; Ng, Shu-Yih.; Othman, R., Goh.; Lee-Yin & Lazan, H. (1998). Isolation, characterization and significance of papaya β -galactanases to cell wall modification and fruit softening during ripening. *Physiologia Plantarum* 104; 105-115.
- Alves, R.E. (1993). *Acerola malpighia emarginata* D.C: fisiologia da maturação e armazenamento refrigerado sob atmosfera ambiente e modificada. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.
- Apezato-da-Glória B & Carmello-Guerreiro S.M (2006). *Anatomia Vegetal*, ed. UFV. p. 438.
- Berilli, S.S., De Oliveira, G.J., Marinho,B.A., Lyra,B.G., De Souza, F.E., Viana,P.A.,Bernardo,S. & Pereira, G.M. (2007). Avaliação da taxa de crescimento de frutos de mamão (*carica papaya* L.) em função das épocas do ano e graus-dias acumulados. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 1; 011-014
- Biswas, A. B.; Mukherjee, A. K. & Rao, C. V. N. (1969). Pectic acid from the pulp of unripe papaya (*Carica papaya*). *Ind. J. Chem.* 7; 588-591.
- Bradford, M.N. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72; 248-254.

- Brett, C.T. & Waldron, K.W. (1996). Physiology and Biochemistry of Plant Cell walls. (2 ed) Cambridge University Press, Chapman & Hall.
- Buckeridge M, S; Cavalari A.A. & Silva G, B. (2008). Parede Celular in Kerbauy G.B 2ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro-RJ. p. 431
- Buckeridge M, S; Cavalari, A.A; Silva, C.O & Tiné, M.A.S.(2006). Relevância dos processos de Biossíntese de polissacarídeo da parede celular para a biotecnologia de frutos *In*: Lajolo F.M. & De Menezes E. Edusp.
- Buckeridge, M.S., Santos, H.P. & Tiné, M.A.S. (2000). Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. Plant Physiology & Biochemistry. 38;141-156.
- Buckeridge, M. S.; Rocha D. C.; Reid J. S. G., Dietrich S. M. C. (1992). Xyloglucan structure and postgerminative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorfii* from savanna and forest populations. Physiol. Plant. 86 (1); 145-151.
- Buckeridge, M.S. & Dietrich, S.M.C. (1996). Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannon in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). Plant Science 117;33-43.
- Buckeridge, M.S., Rayon, C., Urbanowicz, B. Tine, M.A.S. & Carpita, N.C. (2004). The Mixed linkage (1-3), (1-4)-beta-D-Glucans of Grasses. Cereal Chemistry. 81; 115-127.
- Brummell, D.A., (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit. Funct. Plant Biol. 33,103–119.

- Calegario, F.F. (1997). Características Físicas e químicas do fruto do mamão *Carica papaya* em desenvolvimento. Tese de Magister Scientiae. Universidade Federal de Viçosa-MG.
- Carpita, N.C. & McCann, M.C. (2000). The cell wall. *In*: Buchanan, B.B.; Gruissem, W. & Russell, R.J. Biochemistry and molecular biology of plants. 3 ed. American Society of Plant Physiologists, Rockville. p. 52-108.
- Carpita N.; Vergara C. (1998). A recipe for cellulose. *Science* 279 (5351): 672-673.
- Carpita, N.C. McCann, M.; Griffing, L.R. (1996). The plant extracellular matrix: news from the cell's frontier. *Plant Cell* 8 (9): 1451-1463.
- Carpita, N.C.; Gibeaut, D.M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of walls during growth. *Plant J.* 3; 1-30.
- Chan Jr, H.T; Hibbard K., Goo T. & Akamine E.K (1979). Sugar composition of papayas fruit development. *Hort Science*, v. 14; 140-141.
- Crosgrove, D. J. (2000). Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol. Biochem.* 38(1/2); 109-124.
- Costa, N.P. (1998). Desenvolvimento, maturação e conservação pós-colheita de cajá *Spondias mombin* L. Dissertação de Mestrado. Universidade da Paraíba, Areia.
- Crosgrove, D. J. (1997). Relaxation in high-stress environment: the molecular basis of extensible cell walls and cell enlargement. *The Plant Cell* 9; 1013-1041.

- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28; 350-356.
- Eda, S.; K. Kato. (1978). An arabinoxyloglucan isolated from the midrib of the leaves of *Nicotiana tabacum* L. Agric. Biol. Chem. 42; 351-357.
- Encontro Papaya Brasil (Mercado e inovações Tecnológicas para o mamão) realizado em Vitória-ES, outubro (2005). Editor David dos Santos Martins. INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural).
- Fabi J.P. (2007). Identificação de genes com expressão alterada durante o amadurecimento de mamão (*Carica papaya*) e sua possível relação com a qualidade após a colheita. Tese de Doutorado Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP/São Paulo.
- Fischer, L. R. & Bennett, A.B. (1991). Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. 42; 675-703.
- Fry, S.C, Aldington, S.; Hetherington, P.R. & Aitken, J. (1993). Oligosaccharides signals and substrates in the plant cell wall. Plant Physiol. 103; 1-5.
- Gidley, M. J., Lillford, P. J.; Rowlands, D. W.; Lang, P.; Dentini, M.; Crescenzi, V.; Edwards, M.; Fanutti, C. & Reid, J. S. G. (1991). Structure and solution properties of tamarind-seed polysaccharide. Carbohydr. Res. 214; 299-314.
- Glenn, G.M.; Reddy, A.S.N. & Poovaiah, B.W. (1988). Effect of calcium on cell wall structure, protein phosphorylation and protein profile in senescing apples. Plant Cell Physiol. 29; 565-572.

- Gomez M. L. P. A, Lajolo F. M. & Cordenunsi B. R.(1999). Metabolismo de carboidratos durante o amadurecimento do mamão (*Carica papaya* L. cv. Solo): influenciada pela radiação gama Ciênc. Tecnol. Aliment. (19) n.2 Campinas/SP
- Hayashi, T. (1989). Xyloglucans in the primary cell wall. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40; 139-168.
- Huber, D.J. (1984). Strawberry fruit softening: The potential role of polyuronides and hemicelluloses. J. Food Sci. 49;1310-1315.
- IBARF (2008). <http://www.ibraf.org.br/> Alta qualidade - terça-feira, 7 de outubro de 2008 às 11:10 acesso dia 23 de dezembro de 2008.
- Kerbauf G.B Fisiologia Vegetal 2ed Guanabara Koogan (2008). p 431.
- Lashbrook CC, Gonzalez-Bosch C, Bennett AB. (1994). Two divergent endo-beta-1,4 glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscising flowers.Plant Cell. 6;1485-93
- Lazan, H., Ali, M.Z., Liang, K.S & Yee, K.L. (1989). Polygalacturonase activity and variation in ripening of papaya fruit with tissue depth and heat treatment. Physiol. Plant. 77; 93-98.
- Lazan, H.; Ng, Syu-Yih., Goh, Lee-Yin & Ali, M.Z. (2004). Papaya β -galactosidase/galactanase isoformas in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening. Plant Physiol. Biochemistry 42; 847-853.
- Lazan, H.; Selamat, K.M.& Ali, M.Z. (1995). β -galactosidase, polygalacturonase and pectinesterase in differential softening and cell wall modification during papaya fruit ripening. Physiol. Plantarum 95; 106-112.
- Levy, S., York,W.S., Struik-prill. R., Meyer, B., & Staehelin, I.A. (1991).

Simulation of the static and dynamic molecular conformation of xyloglucan. The role of the fucosylated sidechain in surface-specific sidechain folding. *The Plant journal*, 1 (2), 195-215.

Lima, D. U. & Buckeridge, M. S. (2001). Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of degree of galactosylation. *Carb. Pol.* 46; 157-163.

Lima, D. U., Loh, W. & Buckeridge, M. S. (2004). Xyloglucan-cellulose interaction depends on the side chains and molecular weight of xyloglucan. *Plant Physiology and Biochemistry* 42(5);389-394.

Manrique, D. G. & Lajolo, M.F. (2004). Cell-wall polysaccharide modifications during postharvest ripening of papaya fruit (*Carica papaya*). *Posthav. Biol. Technology*. 33; 11-26.

Mc Cann, M.C., Wells, B., Roberts, K. (1990). Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *Journal. Cell. Sci.* 96; 323-334.

Mc Collum, G., Huber, D.J & Cartlife, D. J. (1989). Modification of polyuronides and hemicelluloses during muskmelon fruit softening. *Physiol. Plant.* 76; 303-308.

Morais P.D.L , Da Silva G.G, Menezes J.B, Maia F.E.N, Dantas D.J & Junior R.S (2007). Postharvest shelf life of papaya UENF/CALIMAN 01 produced in Rio Grande do Norte *Rev. Bras. Frutic.* v.29 no.3 Jaboticabal/ SP.

Morais, P.L.D. (2005). Qualidade e bioquímica de parede celular de sapoti *Manilkara sapota*. Von Royen submetido ao 1-metilciclopropeno. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

Manrique, D. G. & Lajolo, M. F. (2004). Cell-wall polysaccharide modifications during postharvest ripening of papaya fruit (*Carica papaya*). *Posthav. Biol. Technology* 33, 11-26.

- Oliveira, C.J.F.J.; Braga, M.R. & Buckeridge, M.S. (2006). Isolamento de oligossacarídeos de xiloglucano de dicotiledôneas através de hidrólise enzimática cromatografia de exclusão molecular. *Revista Brasil. Bot.*, V.29, n.3, p.391-397.
- Paiva, E.M. (2008). Constituintes da Parede Celular de duas cultivares de mamão: influência do estágio de maturação. Dissertação de Mestrado UFP- Recife/PE.
- Paull, R.E. & Chen, N.J. (1983). Postharvest variation in cell wall degrading enzymes of papaya (*Carica papaya* L.) during fruit ripening. *Plant Physiol.* 72; 382-385.
- Paull, R.E., Gross, K. & Qiu, Y. (1999). Changes in papaya cell wall during fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology.* 16; 79-89.
- Rose, J.K.C., Hadfield, K.S., Labavitch, J.M., Bennett, A.B., (1998). Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. *Plant Physiol.* 117, 345–361.
- Roth, I., Clausnitzer, I. (1972). Desarrollo y anatomia del fruto y de la semilla de *Carica papaya* L. (Lechosa). *Acta Botánica Venezuelica*, v. 7; 187-206.
- Santos, A.F. (2001). Fisiologia do crescimento, desenvolvimento e armazenamento pós-colheita de pitangas *Eugenia uniflora* L. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba, Areia.
- Sass, J.E. (1951). *Botanical microtechnique*. The Ioma State College Press, 2a ed., Ames; p 391.
- Soh, Chin-Pin, Ali, M.Z. & Lazan, H. (2006). Characterisation of an α -galactosidase with potential relevance to ripening related texture changes. *Phytochemistry* 67; 242-254.

- Somogy, N. (1952). Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195: 19-23.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2004). Fisiologia Vegetal 3 ed. Ed. Artmed Porto Alegre-RS. p 719.
- Teixeira, G.H.A. (2000). Frutos do bacurizeiro *Platonia insignis* Mart: Caracterização, qualidade e conservação. Dissertação de Mestrado. UNESP, Jaboticabal-SP.
- Tiné, M.A.S.; Silva, C.O.; de Lima, D.U.; Buckeridge, M.S. & Carpita, N.C. (2006). Fine structure of a mixed-oligomer storage xyloglucan from seeds of *Hymenaea courbaril*. Carbohydrate Polymers 66; 444–454.
- Tiné, M.A.S.; Cortelazzo, A.L. & Buckeridge, M.S. (2000). Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae Caesalpinoideae). Plant Sci. 154; 117-126.
- Vinchen, J.P.; Beldman, G.; Niessen, W.M.A. & Voragen, A.G.J. (1996). Degradation of apple fruit xyloglucan by endoglucanase. Carbohydrate Polymers, vol 29; 75-85.
- Vinchen, J.P.; Beldman, G.; Niessen, W.M.A. & Voragen, A.G.J. (1994). The effect of xyloglucans on the degradation of cell-wall embedded cellulose by the combined action of cellobiohydrolase and glucanases from *Trichoderma viride*. Plant Physiol. 104; 99-107.
- Waldron, T.M. & Brett, C. (1990). Physiology and Biochemistry of the plant cell walls. Uniwin Hyman, London; p. 193.
- Watada, A. E., Herner, R. C., Kader, A. A., Romani, R. J. & Staby, G. L. (1984). Terminology for the description of developmental stages of horticultural crops. HortScience 19; 20-21.
- Zhao, M.; Moy, J.; Paull, R.E. (1996). Effect of gamma-irradiation on ripening papaya pectin. Postharvest Biol. Techol. 8; 209-222.