

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E A
TOLERÂNCIA DE FRUTOS CÍTRICOS A BAIXAS
TEMPERATURAS

Nély Holland

Orientadora: Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes

Co-orientadora: Dra. M^a Teresa Lafuente Rodrigues

livro

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de doutora em Tecnologia de Alimentos

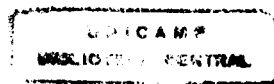
PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Nély Holland aprovada pela Comissão Julgadora em 21 de dezembro de 1998.

Campinas - SP - Brasil
1998

Campinas, 21 de dezembro de 1998

Hilary C. de Menezes
Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes
Presidente da Banca



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO BC/	36381
PROC.	229/99
C	<input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	29/04/99
N.º CPD	

CM-00120447-3

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

H719m

Holland, Nély

Metabolismo de carboidratos e a tolerância de frutos
cítricos a baixas temperaturas / Nély Holland. – Campinas:
SP: [s.n.], 1998.

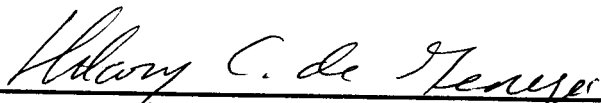
Orientador: Hilary Castle de Menezes

Co-orientadora: Maria Teresa Lafuente Rodrigues

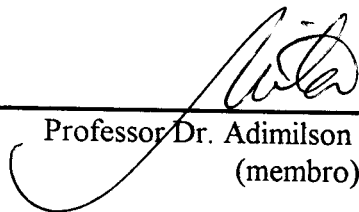
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Frutas cítricas. 2. Carboidratos. 3.Metabolismo.
4.Temperaturas. I.Menezes, Hilary Castle de. II. Lafuente,
Maria Teresa III.Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

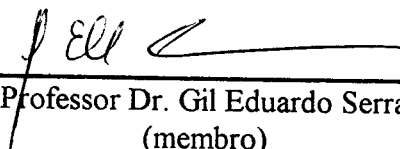
BANCA EXAMINADORA



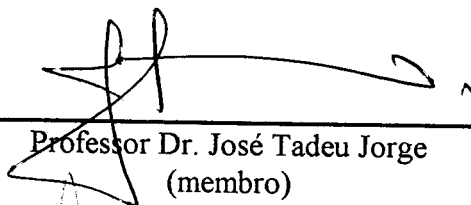
Professora Dra. Hilary Castle de Menezes
(orientadora)



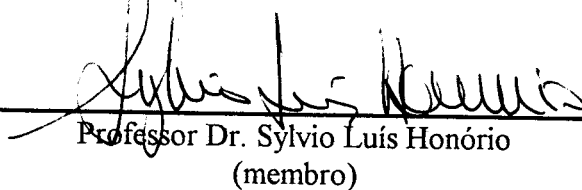
Professor Dr. Adimilson Bosco Chitarra
(membro)



Professor Dr. Gil Eduardo Serra
(membro)



Professor Dr. José Tadeu Jorge
(membro)



Professor Dr. Sylvio Luís Honório
(membro)

Professora Dra. Maria Isabel Fernandes Chitarra
(suplente)

Professora Dra. Gláucia Maria Pastore
(suplente)

Campinas, de dezembro de 1988.

Ao meu grande amigo e pai
“...Qualquer dia amigo a gente vai se encontrar...”

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida da maneira como me foi concedida.

Aos meus pais, Elcias e Rosalina, pelos bons exemplos de honestidade, dignidade, pelo incentivo e amor.

Ao Guilherme, pelo seu companheirismo, amor e por me fazer feliz.

A professora Hilary pela orientação, apoio e compreensão.

Aos amigos, alguns que eu já conhecia, e outros que conheci durante o curso: é um grande privilégio ter a amizade de vocês; que o tempo e a distância sirvam somente para reforçá-la.

Ao professor e amigo Josivan Barbosa Menezes pelas sugestões em algumas metodologias.

A Universidade Federal de Goiás (UFG) pela liberação para a realização do curso.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização do curso.

A CAPES-PICDT e CNPq pela bolsa de estudos concedida no Brasil e Espanha, respectivamente.

A Teresa, pela oportunidade em desenvolver grande parte da tese sob a sua orientação, pela atenção, por sua sensibilidade e exemplo de dedicação profissional.

A pesquisadora Dolores Mallent pela sua atenção e disponibilidade em ajudar-me com o cromatógrafo.

Aos pesquisadores Lorenzo e Sr. Sala pela boa recepção.

À Fernando, Lolita, Inmaculada, Maria José, Amparo, Maite, Eve, pelo auxílio, carinho e inesquecíveis tempos de convívio.

A todas as pessoas do Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) que tive o prazer de conhecer e estimar.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 1.....	xi
LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 2.....	xi
LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 3.....	xi
LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 5.....	xi
LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 6.....	xi
LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 1.....	xii
LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 2.....	xii
LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 3.....	xiii
LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 4.....	xiv
LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 5.....	xiv
LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 6.....	xv
RESUMO GERAL.....	xvi
SUMMARY.....	xvii
INTRODUÇÃO.....	01
CAPÍTULOS	
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
1.1. Bases fisiológicas e bioquímicas associadas ao estresse pelo frio.....	04
1.1.1. Respostas primárias e secundárias.....	04
1.1.2. Carboidratos.....	08
1.1.3. Alterações na atividade da fenilalanina-amoniolase.....	11
1.1.4. O estresse oxidativo.....	11

1.1.5. Alterações hormonais.....	13
1.1.5.1. Produção de etileno.....	13
1.1.5.2. Ácido abscísico.....	13
1.1.5.3. Poliaminas.....	14
1.1.6. Proteínas de choque pelo calor.....	14
1.1.7. Fatores que influenciam na Injúria pelo frio.....	16
1.1.8. Métodos para evitar ou minimizar as injúrias causadas pelo frio.....	18
1.2. Metabolismo dos carboidratos.....	20
1.2.1. Respiração, desenvolvimento e amadurecimento dos frutos.....	20
1.2.2. Mobilização do amido.....	22
1.2.3. Síntese e hidrólise da sacarose.....	24
1.3. Parede celular.....	26
1.3.1. Constituintes da parede celular.....	26
1.3.2. Variações dos constituintes da parede celular durante o desenvolvimento e o amadurecimento dos frutos.....	28
1.3.3. Grau de metil esterificação.....	30
1.3.4. Alteração da atividade enzimática pelo frio e calor.....	31
1.3.5. Síntese de parede celular durante o amadurecimento e armazenamento.....	31
1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
 2. CARACTERIZAÇÃO DO SUCO E DO FLAVEDO DE TANGERINAS	
‘FORTUNE’ DURANTE A MATURAÇÃO.....	43
RESUMO.....	44
SUMMARY.....	45
2.1. INTRODUÇÃO.....	46
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.2.1. Material vegetal.....	47
2.2.2. Análise estatística.....	48
2.2.3. Análises realizadas para a curva de maturação.....	48
2.2.3.1. Peso.....	48

2.2.3.2. Diâmetro transversal e longitudinal.....	48
2.2.3.3. Cor.....	48
2.2.3.4. Sólidos solúveis totais (SST).....	48
2.2.3.5. pH.....	48
2.2.3.6. Acidez total titulável (ATT).....	48
2.2.3.7. Determinação de açúcares do flavedo (extração, purificação e condições do equipamento).....	48
2.2.3.8. Determinação de amido.....	49
2.2.3.9. Extração e determinação da reação de atividade das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS) e sacarose sintase (SS).....	50
2.2.3.10. Determinação de proteínas totais.....	51
2.2.3.11. Escala subjetiva de danos por frio no flavedo.....	51
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
2.3.1. Características físicas e químicas do fruto.....	51
2.3.1.1. Peso e diâmetros (transversal e longitudinal).....	51
2.3.1.2. Cor.....	52
2.3.1.3. pH , °Brix e ratio.....	53
2.3.1.4. Modificações no conteúdo de carboidratos do flavedo (sacarose, glicose, frutose e amido).....	55
2.3.1.5. Atividades das enzimas sacarose fosfato sintase (SPSVmax e SPSlim) e sacarose sintase (SS), e conteúdo de proteínas.....	59
2.4. CONCLUSÕES.....	61
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
 3. INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO DE CURA NA SUSCEPTIBILIDADE À INJÚRIA PELO FRIO E NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DE TANGERINAS ‘FORTUNE’.....	 66
RESUMO.....	67
SUMMARY.....	69
3.1. INTRODUÇÃO.....	71

3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	72
3.2.1. Material vegetal.....	72
3.2.2. Delineamento experimental e análises estatísticas.....	73
3.2.3. Análises realizadas nos experimentos de 96/97.....	73
3.2.3.1. Perda de Massa.....	73
3.2.3.2. Escala subjetiva de danos por frio no flavedo.....	73
3.2.3.3. Determinação dos gases etileno e dióxido de carbono (CO ₂).....	74
3.2.4. Análises químicas realizadas nos experimentos de 93/94 e 96/97.....	75
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
3.3.1. Injúria pelo frio.....	75
3.3.2. Perda de massa.....	77
3.3.3. Produção de CO ₂	80
3.3.4. Produção de etileno.....	83
3.3.5. Carboidratos.....	86
3.3.6. Atividades das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS) e sacarose sintase (SS).....	93
3.4. CONCLUSÕES.....	97
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
4. EFEITO DO TRATAMENTO DE CURA NAS MODIFICAÇÕES DO CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS DE LARANJAS RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS AO FRIO DURANTE O ARMAZENAMENTO À BAIXA TEMPERATURA.....	103
RESUMO.....	104
SUMMARY.....	106
4.1. INTRODUÇÃO.....	107
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	108
4.2.1. Material vegetal.....	108
4.2.2. Delineamento experimental e análises estatísticas.....	108
4.2.3. Métodos.....	109

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	109
4.3.1. Injúria pelo frio.....	109
4.3.2. Modificações no conteúdo de carboidratos (sacarose, glicose, frutose e amido) do flavedo.....	111
4.3.3. Atividades das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS Vmax e Lim) e sacarose sintase (SS), e conteúdo de proteínas totais.....	121
4.4. CONCLUSÕES.....	123
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
5. MODIFICAÇÕES NOS COMPONENTES DA PAREDE CELULAR DO FLAVEDO E ALBEDO DE TANGERINAS ‘FORTUNE’ DURANTE A MATURAÇÃO.....	127
RESUMO.....	128
SUMMARY.....	129
5.1. INTRODUÇÃO.....	130
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	130
5.2.1. Material vegetal.....	130
5.2.2. Análises estatísticas.....	131
5.2.3. Análises realizadas para a curva de maturação.....	131
5.2.3.1. Extração do material de parede celular.....	131
5.2.3.2. Determinação das frações pécticas.....	132
5.2.3.3. Determinação de pectina total.....	132
5.2.3.4. Determinação do grau de esterificação - GE (%).....	132
5.2.3.5. Determinação de celulose e hemicelulose.....	133
5.2.3.6. Escala subjetiva de danos por frio no flavedo.....	133
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	133
5.3.1. Material de parede celular.....	133
5.3.2. Pectina total e grau de esterificação.....	135
5.3.3. Frações pécticas.....	137
5.3.4. Hemicelulose e celulose.....	139

5.4. CONCLUSÕES.....	141
5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	142
 6. MODIFICAÇÕES DOS COMPONENTES DA PAREDE CELULAR DE TANGERINAS 'FORTUNE' INDUZIDAS PELA ALTA TEMPERATURA E DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO.....	 145
RESUMO.....	146
SUMMARY.....	148
6.1. INTRODUÇÃO.....	150
6.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	151
6.2.1. Material vegetal.....	151
6.2.2. Delineamento experimental e Análises estatísticas.....	152
6.2.3. Métodos.....	152
6.2.3.1. Determinação da textura.....	152
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	153
6.3.1. Material de parede celular.....	153
6.3.2. Pectina total e grau de esterificação.....	155
6.3.3. Frações pécticas.....	158
6.3.4. Hemicelulose e celulose.....	163
6.3.5. Textura.....	166
6.4. CONCLUSÕES.....	169
6.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	169
7. CONCLUSÕES GERAIS.....	172

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 1

Página

1. Componentes da parede celular..... 27

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 2

Página

1. Concentração de amido no flavedo de frutos de tangerinas 'Fortune' ($\mu\text{g/g}$ de material fresco), durante a maturação nos anos de 1993/94 57

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 3

Página

1. Valores médios da produção de etileno e CO_2 , e seus respectivos desvios padrões, durante os 3 dias de cura 82

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 5

Página

1. Índice de danos por frio (IDF) de tangerinas 'Fortune' e teor dos polissacarídeos (mg/g SIE) da parede celular do flavedo de frutos armazenados a 2°C por 28 dias 141

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 6

Página

1. Teor de sólidos insolúveis em etanol (SIE) do flavedo (F) e albedo (A), e seus respectivos desvios padrões, de tangerinas 'Fortune' em três estádios de maturação a 0 e 30 dias de armazenamento a 2 e 12°C de frutos com (C) e sem cura (NC)..... 154
2. Teor de pectina total (mg/g), grau de esterificação (GE-%), e seus respectivos desvios padrões, do flavedo e albedo de tangerinas 'Fortune' em

três estádios de maturação a 0 e 30 dias de armazenamento a 2 e 12°C de frutos com (C) e sem cura.(NC)	157
3. Teor de pectina solúvel em ácido (PSH-mg/g) do flavedo (F) e albedo (A), e seus respectivos desvios padrões, de tangerinas 'Fortune' em três estádios de maturação, a 0 e 30 dias de armazenamento a 2 e 12°C de frutos com (C) e sem cura.(NC).....	159
4. Teor de pectina solúvel em água (PSA-mg/g) do flavedo (F) e albedo (A), e seus respectivos desvios padrões, de tangerinas 'Fortune' em três estádios de maturação, a 0 e 30 dias de armazenamento a 2 e 12°C de frutos com (C) e sem cura.(NC).....	161
5. Teor de pectina solúvel em oxalato de amônia (PSO-mg/g) do flavedo (F) e albedo (A), e seus respectivos desvios padrões, de tangerinas 'Fortune' em três estádios de maturação, a 0 e 30 dias de armazenamento a 2 e 12°C de frutos com (C) e sem cura (NC)	162
6. Teor de hemicelulose (mg/g) e celulose (mg/g) do flavedo (F) e albedo (A), e seus respectivos desvios padrões, de tangerinas 'Fortune' em três estádios de maturação, a 0 e 30 dias de armazenamento a 2 e 12°C de frutos com (C) e sem cura (NC).....	165

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 1

	Página
1. Degradação do amido e síntese da sacarose.....	23

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 2

	Página
1. Mudanças no peso, tamanho e cor dos frutos de tangerinas 'Fortune' durante a maturação em 1996/97.....	53
2. Mudanças de acidez total titulável (ATT - % ácido cítrico/100g), pH e °Brix dos frutos de tangerinas 'Fortune' durante a maturação em 1996/97.....	54
3. Sacarose, glicose, frutose (mg/g) e amido (µg/g) do flavedo de tangerinas 'Fortune' durante a maturação.....	58
4. Atividades específicas (µg/g prot.min) das enzimas sacarose fosfato sintase	

(SPS V _{máx} e SPS _{lim}) e sacarose sintase (SS), e proteínas totais (mg/g) do flavedo de tangerinas 'Fortune' em colheitas de 1996/97.....	60
---	----

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 3

	Página
1. Índice de danos por frio, em três estádios de maturação, durante o armazenamento refrigerado de tangerinas 'Fortune' com e sem cura.....	76
2. Perda de massa (%), em três estádios de maturação, durante o armazenamento refrigerado de tangerinas 'Fortune' com e sem cura.....	79
3. Produção de CO ₂ (µl/g.h) de tangerinas 'Fortune', em três estádios de maturação, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura.....	81
4. Produção de etileno (nl/g.h) de tangerinas 'Fortune', em três estádios de maturação, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura.....	85
5. Sacarose, glicose e frutose (mg/g) do flavedo de tangerinas 'Fortune', em três estádios de maturação durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura em 1993/94.....	88
6. Sacarose, glicose e frutose (mg/g) do flavedo de tangerinas 'Fortune', em três estádios de maturação, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura em 1996/97.....	89
7. Amido (µg/g) do flavedo de tangerinas 'Fortune', em três estádios de maturação, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura nos anos de 1993/94 e 1996/97.....	90
8. Atividades específicas (µg/g prot.min) das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS V _{máx} e SPS _{lim}) e sacarose sintase (SS) do flavedo de tangerinas 'Fortune', em três estádios de maturação, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura em 1993/94.....	95
9. Atividades específicas (µg/g prot.min) das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS V _{máx} e SPS _{lim}) e sacarose sintase (SS) do flavedo de tangerinas 'Fortune', em três estádios de maturação, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura em 1996/97.....	96

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 4

	Página
1. Índice de danos por frio de duas colheitas de laranjas ‘Navelate’ e ‘Pinalate’ durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura.....	111
2. Sacarose (mg/g) do flavedo de laranjas ‘Navelate’ e ‘Pinalate’, de duas colheitas, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura.....	114
3. Glicose (mg/g) do flavedo de laranjas ‘Navelate’ e ‘Pinalate’, de duas colheitas, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura.....	115
4. Frutose (mg/g) do flavedo de laranjas ‘Navelate’ e ‘Pinalate’, de duas colheitas, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura.....	116
5. Amido ($\mu\text{g/g}$) do flavedo das laranjas ‘Navelate’ e ‘Pinalate’, de duas colheita, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura.....	119
6. Atividades específicas ($\mu\text{g/g prot.min}$) das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS $V_{\text{máx}}$ e SPS lim) e sacarose sintase (SS) do flavedo das laranjas ‘Navelate’ e ‘Pinalate’, de duas colheitas, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura.....	121

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 5

	Página
1. Sólidos insolúveis em etanol (SIE - %) do flavedo e albedo de tangerinas ‘Fortune’ durante a maturação.....	134
2. Pectina total (mg/g) e grau de esterificação da pectina (%) do flavedo e albedo de tangerinas ‘Fortune’ durante a maturação.....	136
3. Frações pécticas (mg/g) do flavedo e albedo de tangerinas ‘Fortune’ durante a maturação: pectina solúvel em HCl (PSH), pectina solúvel em água (PSA) e pectina solúvel em oxalato de amônia (PSO).....	138
4. Hemicelulose (mg/g) e celulose (mg/g) do flavedo e albedo de tangerinas ‘Fortune’ durante a maturação.....	140

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 6

Página

1. Avaliação da textura (kgf) de tangerinas 'Fortune' durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura.....	167
---	-----

teor de pectina total, hemicelulose e celulose foi maior para o albedo do que para o flavedo. Com o processo de cura e após 30 dias de armazenamento em alguns tratamentos, observou-se que no flavedo e albedo: ocorreu síntese de parede celular; houve aumento de pectina total nos estádios I e II de maturação e diminuição no estágio III e; houve diminuição da hemicelulose e somente após os 30 dias de armazenamento uma diminuição da celulose. No estágio III, quando os frutos estavam mais maduros, verificou-se a melhor relação entre a diminuição da fração insolúvel de pectina - PSH (pectina solúvel em HCl) e o aumento das frações solúveis da pectina - PSA (pectina solúvel em água) e PSO (pectina solúvel em oxalato de amônia). Em relação a susceptibilidade das tangerinas ao frio com as modificações dos polissacarídeos da parede celular durante a maturação dos frutos, somente se pôde observar maior diminuição de hemicelulose em resposta ao estresse pelo frio durante o armazenamento a 2°C. A textura dos frutos diminuiu do estágio II para o III de maturação com a cura e durante o armazenamento dos frutos, principalmente a 12°C.

SUMMARY

The influence of carbohydrate metabolism on the acclimation of citrus fruits to cold stress has been studied. Fruits susceptible to chilling injury, such as 'Fortune' mandarins and 'Navelate' oranges, and a chilling tolerant citrus variety ('Pinalate' oranges, a Navelate mutant) harvested at different maturity stages were used. Half of these fruits were submitted to a curing treatment and cold stored at 2 and 12°C. The other half were stored without a curing treatment.

Starch and reducing sugars increased in the flavedo with the maturity of 'Fortune' mandarins from November to March, but they decreased when fruits reached the required internal maturity index (juice). The activity of sucrose phosphate synthase enzyme (SPS) in the flavedo was lower at this stage. The SPS V_{max} activity was higher than that of sucrose synthase (SS) in the less mature fruits, whereas the SS activity was higher in the more mature ones. The rate of CO₂ and ethylene production increased when 'Fortune' mandarins were exposed to high temperature conditioning. This pretreatment avoided chilling damage in the flavedo of mandarins and reduced it in 'Navelate' oranges. The general results show that the carbohydrate metabolism may be one of the mechanisms involved in the acclimation of citrus fruits to chilling stress. The highest levels of sucrose were found in conditioned fruits stored at 2°C. However, the content of reducing sugars and starch decreased in fruits exposed to those postharvest treatments. The contents of sucrose, glucose, fructose and starch were, in general, higher in the chilling tolerant 'Pinalate' fruits than in the chilling sensitive 'Navelate' oranges. The SPS and SS enzyme activities were higher in the cultivar 'Pinalate' than in 'Navelate', which may be related to the higher carbohydrate contents of 'Pinalate'. In general, the SPS V_{max} and SS activities increased as a result of conditioning the fruits at 37°C. Conditioning also originated an increase in sucrose in the 'Navelate' and 'Pinalate' oranges, whereas the effect of this treatment on the 'Fortune' mandarins varied from one stage of maturity to the others.

Changes with maturity and the effect of conditioning on the cell wall material, or ethanol-insoluble solids (EIS), and their components were also evaluated in 'Fortune' mandarins stored at 2 and 12°C. The EIS decreased in the flavedo and albedo with maturation of fruits. In general, the total pectin, hemicellulose and cellulose contents were higher in the albedo than in the flavedo of fruits harvested at different maturity stages or exposed to the postharvest treatments assayed. Cell wall

components synthesis had apparently occurred in the flavedo and albedo with the cure procedure and after 30 days of storage with some of the treatments; there was an increase in total pectin in stages I and II of maturation and a decrease in stage III; there was a decrease in hemicellulose and after 30 days of storage, a decrease in cellulose as well. A better relationship between the decrease in the insoluble pectin fraction (ASP, pectin insoluble in HCl) and the increase in the soluble fractions of pectin (WSP, water soluble fraction) and OSP (pectin soluble in ammonium oxalate) was found in the more mature fruits (stage III). Changes in the cell wall polysaccharides during fruit ripening appear to be related with its chilling susceptibility. However, hemicellulose was the only cell wall component that clearly decreased in response to cold stress during storage at 2°C. The texture of the fruits declined with maturity from the stage II to the stage III and also after conditioning or storing the fruits, especially at 12°C.

INTRODUÇÃO

No Brasil, o cultivo de fruteiras tem passado por um notável desenvolvimento nas últimas décadas. A produção de frutos cítricos, principalmente de laranjas, é a mais expressiva, sendo que a colheita de 1997 foi de 17,95 milhões de toneladas. A terça parte desta produção é consumida *in natura* no país e os dois terços restantes são transformados em suco, 85% dos quais destinam-se ao mercado externo. A produção de tangerinas é cerca de 600 mil toneladas, sendo que a murcote é a variedade mais exportada, mas o total de vendas externas é pequeno, da ordem de 1% da produção (AGRIANUAL, 1998). Porém, a existência de uma grande variedade de frutos produzidos no Brasil, devido a diversidade climática, possibilita também um considerável interesse no comércio interno e externo destes.

Para melhor conservação pós-colheita de frutos *in natura*, tem-se utilizado a tecnologia do frio. A temperatura desempenha um papel importante no metabolismo de frutos e hortaliças. Reduzindo-se a temperatura, diminui-se o metabolismo e prolonga-se, portanto, o tempo de vida útil dos vegetais. A refrigeração e o congelamento são os principais meios utilizadas por pesquisadores da área de alimentos para manter a qualidade de frutos e hortaliças. Entretanto, alguns tecidos das plantas são sensíveis a baixas temperaturas. Os frutos sensíveis mostram uma variedade de sintomas provocados pela injúria ao frio, geralmente após serem retirados do armazenamento sob baixas temperaturas (JACKMAN *et al.*, 1988; PARKIN *et al.*, 1989).

Devido a vários fatores que influenciam na maior ou menor susceptibilidade dos frutos ao frio, mesmo sob condições ideais de armazenamento, tais como temperatura e umidade relativa, circulação uniforme e renovação do ar, os frutos sofrem com frequência a injúria pelo frio.

Tem-se utilizado vários métodos a fim de se evitar ou minimizar as perdas de vegetais por danos pelo frio. Um dos métodos mais efetivos tem sido o dos tratamentos térmicos. O aquecimento dos frutos e hortaliças entre 35 e 45°C inibe reversivelmente a maturação, reduz as desordens fisiológicas e aumenta a resistência ao ataque por patógenos (LURIE & KLEIN, 1991). Entretanto, ao mesmo tempo que existe a necessidade de se desenvolver novas tecnologias para a conservação de frutos e

hortaliças, também é importante conhecer as transformações e os mecanismos que as controlam, quando os vegetais sofrem tratamentos pré ou pós-colheita ou sob condições de estresse durante o armazenamento sob refrigeração.

Os carboidratos solúveis podem ter um papel direto ou indireto na proteção dos constituintes celulares das plantas sensíveis a temperaturas de resfriamento, assim como aspectos qualitativos e quantitativos dos carboidratos podem estar envolvidos no mecanismo de resistência. Porém, não está estabelecido o nível crítico limite de carboidratos solúveis e a responsabilidade primária para reduzir a susceptibilidade dos vegetais às baixas temperaturas.

Considerando-se o que foi exposto anteriormente, este trabalho tem como objetivo geral estudar a influência dos carboidratos no aumento da resistência ao frio, e como objetivos específicos: a) estudar a existência da relação entre as mudanças na susceptibilidade dos cítricos ao frio com a maturação e o teor em carboidratos; b) estudar as mudanças nos açúcares, induzidas pelo estresse provocado por baixas temperaturas, e a sua possível relação com alteração na susceptibilidade ao frio; c) determinar o efeito dos pré-tratamentos e armazenamento sobre a susceptibilidade ao frio, na qualidade dos frutos e no teor de carboidratos; d) estudar as mudanças dos açúcares de laranjas de variedades resistente e sensível ao frio, a fim de auxiliar no entendimento do papel fisiológico dos açúcares na susceptibilidade dos frutos cítricos ao frio; e) Avaliar as alterações provocadas pelo tratamento térmico e injúria ao frio nos constituintes da parede celular.

Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em geral, todos os tipos de estresses, incluindo o frio, provocam uma série de respostas pelas plantas.

De acordo com BOHNERT *et al.* (1995) pode ser assumido que todas as plantas têm capacidade para a percepção do estresse, avisar e responder. Primeiro, a maior parte das espécies cultivadas são relativamente selvagens e exibem excelente tolerância ao estresse abiótico. Segundo, estudos bioquímicos têm revelado similaridades em processos induzidos pelo estresse que levam ao acúmulo de metabólitos em plantas, algas, fungos e bactérias. Esses metabólitos incluem compostos nitrogenados (prolina, outros aminoácidos, compostos amino quaternários e poliaminas) e compostos hidroxil (sacarose, polióis e oligossacarídeos). Terceiro, estudos moleculares têm revelado que uma larga variedade de espécies expressam um grupo comum de genes e proteínas similares quando estressadas.

1.1. Bases Fisiológicas e Bioquímicas Associadas ao Estresse pelo Frio

Várias alterações fisiológicas e bioquímicas ocorrem nas plantas, em resposta ao estresse pelo resfriamento. A extensão destas alterações e a habilidade da planta em suportá-las determinam se ela é sensível ou resistente à injúria pelo frio a uma certa temperatura.

O termo injúria pelo frio (IF) tem sido usado para descrever os prejuízos fisiológicos que ocorrem em muitas plantas e seus produtos, como resultado da exposição a baixas temperaturas, que não sejam temperaturas de congelamento (PARKIN *et al.*, 1989). O processo de injúria pelo frio deveria ser considerado em duas fases, sendo a primeira indicativa da resposta primária, e ocorrendo instantaneamente em alguma temperatura limite, seguida por eventos ou respostas secundárias que levam a sintomas visíveis, dependentes do tempo e temperatura de exposição (RAISON & LYONS, 1986).

1.1.1. Respostas primárias e secundárias

LYONS & RAISON (1970) foram os primeiros pesquisadores a sugerir que a fase de transição física das membranas do estado líquido cristalino para a estrutura gel sólido, determinada pela relação entre ácidos graxos saturados e insaturados, seria a resposta primária de vegetais sensíveis ao frio. Plantas resistentes ao frio não mostraram a fase de

transição física das membranas, ou mudança repentina da atividade enzimática, às temperaturas na faixa de resfriamento. Eles verificaram também que a atividade respiratória de mitocôndrias isoladas, de vegetais sensíveis, exibem uma mudança abrupta na temperatura crítica da injúria. Porém, as alterações das membranas, induzidas por temperatura de resfriamento, não são restringidas às mitocôndrias. Elas também ocorrem em outras organelas como glioxissomas e proplastídeos.

CHITARRA & CHITARRA (1990) descrevem que o efeito primário da temperatura nas membranas das células vegetais afeta suas propriedades, particularmente a das enzimas associadas com as membranas, envolvidas na produção de energia (ATP) e síntese protéica. Esse fenômeno ocorre a temperaturas entre 10 e 15°C nos produtos tropicais e entre 0 e 5°C para os produtos temperados que são sensíveis à injúria. Essas temperaturas estão correlacionadas com o início da injúria. A fase de transição ou de separação dos lipídeos da membrana tem sido proposta como causa principal da injúria, porém o seu papel não está completamente elucidado.

Embora seja de consenso geral que as mudanças físicas nas membranas seja a resposta primária de vegetais ao estresse pelo resfriamento, não há um consenso geral se a composição de lipídeos da membrana possui ou não um papel decisivo na determinação do estado físico desta, e da sensibilidade de plantas ao frio.

Existe uma hipótese de que a IF é essencialmente uma forma acelerada de senescência, na qual os efeitos adversos da temperatura baixa no metabolismo de lipídeos e na função da membrana fazem surgir uma cascata de reações deteriorativas, resultando na morte da célula. Supõe-se que a clivagem dos lipídeos da membrana, pelas acil hidrolases, produzindo ácidos graxos livres, seja um dos primeiros eventos na senescência (THOMPSON, 1984 *apud* WHITAKER, 1991).

Estudando a relação entre a susceptibilidade de plantas e solidificação da mistura de ácidos graxos insaturados e saturados (LYONS & ASMUNDSON, 1965 *apud* WANG, 1982) descobriram que uma ligeira diferença na quantidade de ácidos graxos insaturados da mistura, teria um efeito marcante na solidificação destas misturas, e que isto poderia ser significativo na determinação da susceptibilidade ao frio, de determinadas espécies de vegetais. Algumas variedades de tomates tolerantes ao resfriamento

apresentaram teores mais altos de ácidos graxos insaturados, particularmente ácido linoleico, no estágio verde-maturo, do que tomates não tolerantes (TABACCHI, 1978 e 1979 *apud* WANG, 1982).

Entretanto, BERGEVIN *et al.* (1993), avaliaram o efeito do frio (1°C - 85% UR) com subsequente armazenamento a 20°C, no vazamento eletrolítico e composição de ácidos graxos de fosfolípidos do pericarpo de tomates, e foi verificado que as pequenas mudanças na composição de ácidos graxos de fosfolípidos (ligeiro aumento em ácido linolênico), durante o resfriamento de tomates, não seriam o motivo do aumento da permeabilidade da membrana. A aparente diminuição no vazamento eletrolítico, após o retorno do fruto a 20°C, pode ser devido à degradação da parede celular, sugerindo limitações para o uso da condutividade elétrica do tecido para as medidas da IF em tomates.

NGUYEN & MAZLIAK (1990), observaram que o colapso de galactolípidos em tomates sempre acompanha a indução da IF. Esta classe de lípidos é a única que sempre degrada no caso da indução à IF, o que nunca ocorreu no caso de uma maturação normal.

As tangerinas 'Fortune' armazenadas a 2,5°C durante 40 dias, segundo MULAS *et al.* (1996), apresentaram diminuição do ácido linolênico em galactolípidos e aumento em lípidos polares deste ácido graxo, bem como dos ácidos oléico e linoléico. Estas modificações determinaram um perfil maior de ácidos graxos insaturados em lípidos polares do flavedo dos frutos resfriados em comparação aos armazenados a 20°C.

Tem-se proposto que a eficácia do acondicionamento a altas temperaturas, aumentando a tolerância aos danos pelo frio, está mais relacionada com o aumento em ácidos graxos insaturados do que com a biossíntese exclusiva de fosfolípidos (CLARKSON *et al.*, 1980). Na aclimação de pomelos foi observado um aumento nos níveis de ácido linoléico do flavedo, determinando maior grau de insaturação dos ácidos graxos (NORBY & YELENOSKY, 1984). De acordo com MULAS *et al.* (1996) a eficácia do tratamento de acondicionamento de 3 dias a 37°C para evitar os danos pelo frio nos frutos 'Fortune', parece estar relacionada com o aumento na biossíntese de ácidos graxos.

A influência dos ácidos graxos insaturados de plantas e bactérias, na fluidez da membrana, tem sido testada pela engenharia genética. Aumentando os níveis de lipídeos insaturados foi observado a diminuição da sensibilidade ao resfriamento; contrariamente, a maior susceptibilidade ao frio foi obtida pelo aumento nas quantidades de ácidos graxos 16:0 (MURATA *et al.*, 1992; WOLTER *et al.*, 1992). Estes resultados tornam-se um desafio quando observa-se um mutante *Arabidopsis*, tolerante ao frio com mais alto teor de ácidos graxos de alto ponto de fusão do que aqueles descobertos na maioria das plantas sensíveis ao frio, provavelmente indicando que existem múltiplos fatores envolvendo a susceptibilidade ao frio (WU & BROWSE, 1995).

A mudança da fase física das membranas pode ou não conduzir a respostas secundárias ou mudanças irreversíveis, dependendo da temperatura, do tempo de exposição e da susceptibilidade das espécies vegetais a uma dada temperatura. Tem sido proposto que após um período prolongado de exposição de espécies sensíveis ao frio, esta causa primária levaria a perda da integridade da membrana, vazamento de solutos, perda de compartimentalização, diminuição da taxa de atividade oxidativa da mitocôndria, aumento da energia de ativação de enzimas associadas à membrana, paralisação do fluxo protoplasmático, redução do suprimento e utilização de energia, diminuição na taxa fotossintética, desorganização da estrutura celular, disfunção do metabolismo, acúmulo de substâncias tóxicas, e a manifestação de grande variedade dos sintomas de injúria ao frio (WANG, 1982). Talvez, a maior parte dos sintomas aparentes de referência geral são depressões na superfície, áreas necrosadas, escurecimento da polpa e descoloração externa dos frutos e hortaliças (LYONS, 1973).

Concomitante ao desenvolvimento dos sintomas de danos provocados pelo frio, há uma alteração na produção de etileno e na velocidade da respiração dos tecidos. O aumento na taxa respiratória, devido a temperaturas de resfriamento, tem sido observado em muitos produtos sensíveis ao frio, tais como frutos cítricos, pepinos, batatas doces, etc. O mecanismo deste estímulo não é bem conhecido, mas supõe-se que o estímulo do consumo de O₂ seja devido ao desacoplamento da fosforilação oxidativa. Desta forma, o aumento da taxa respiratória, após um período prolongado de exposição à temperatura

baixa, pode ser indicativo de distúrbios metabólicos irreversíveis e do acúmulo de intermediários oxidáveis (CHITARRA & CHITARRA, 1990).

Já em bananas, frutos climatéricos, os quais podem amadurecer após a colheita, a resposta respiratória ao resfriamento é muito diferente. PANTÁSTICO *et al.* (1967) *apud* WANG (1982) observaram que a respiração a 20°C foi diminuída e a elevação climatérica foi retardada após 1 ou 2 dias a 5°C. Após 5 dias a 5°C, a respiração foi completamente inibida e não ocorreu elevação climatérica. Em consequência, os frutos perderam a capacidade de amadurecimento após resfriamento prolongado.

Portanto, tem-se verificado que as temperaturas baixas podem ocasionar acréscimo ou decréscimo na taxa de consumo de O₂. Em ambos os casos, devido às consequências prejudiciais, a atividade respiratória (o consumo de O₂ e a liberação de CO₂) tem sido sugerida como uma característica para medir a extensão da injúria nos tecidos.

Ainda que a teoria de alteração da membrana seja a mais aceita, sendo considerada uma resposta primária, outras teorias têm sido propostas.

1.1.2. Carboidratos

Têm-se sugerido que os açúcares podem evitar as alterações nas membranas, induzidas pelas baixas temperaturas. Este efeito se deve principalmente a sua afinidade pela água, e o fato de que se ligam diretamente às proteínas evitando a sua desnaturação LEVITT (1972).

PURVIS *et al.* (1979) verificaram a alteração de açúcares redutores na casca de pomelos, colhidos em diferentes épocas do ano (Flórida-USA), e armazenados a 4,4°C durante 30 dias. A maior resistência à IF ocorreu em fevereiro-março, correspondendo à maior concentração de açúcares redutores. A correlação entre níveis de açúcares redutores e resistência ao frio sugere que o aumento dos níveis de açúcares redutores ajudam na resistência da casca de pomelos à IF, talvez pela estabilização das membranas celulares.

Em trabalhos com centeio do inverno (HURRY *et al.*, 1994) e com trigo da primavera e inverno (HURRY *et al.*, 1995), a forte recuperação da fotossíntese, após o “endurecimento” ou aclimação ao frio (temperatura do dia e da noite igual a 5°C),

indicou que a elevação de enzimas fotossintéticas, bem como aquelas envolvidas na síntese de sacarose, era uma resposta de adaptação, que permitia a estas plantas maximizarem a produção de açúcares que têm funções crioprotetora e de armazenamento, as quais são vitais à performance destas cultivares durante todo o inverno.

GUY *et al.* (1992) verificaram que folhas de espinafre desenvolvidas a 25°C por 3 semanas, e então colocadas a 5°C, tiveram grande acúmulo de teores de sacarose, glicose e frutose, e a sacarose foi o mais abundante açúcar livre antes, durante e após a exposição a 5°C. A atividade da sacarose fosfato sintase (SPS) foi significativamente aumentada pelo tratamento a temperatura baixa, enquanto as da sacarose sintase (SS) e invertase não foram. TOGNETTI *et al.* (1990), em um estudo com cultivares de trigo submetidas a um período de frio, reportaram o aumento na atividade da SPS e da SS, assim como altos níveis de sacarose e frutanas. Os dados mostraram estreita interrelação do metabolismo de sacarose e frutanas com a habilidade paralela das cultivares permanecerem em temperaturas de congelamento.

Tem-se mostrado que durante o congelamento, as frutanas armazenadas nas coroas dos cereais são convertidas a frutose e sacarose. Estes açúcares simples acumulam-se no citosol e são convertidos novamente a frutanas com o descongelamento da coroa (OLIEN & CLARK, 1993). Os mesmos autores reportaram que as plantas tornam-se predispostas à injúria pelo congelamento quando o total de frutanas torna-se esgotado e açúcares simples não podem mais ser liberados no citosol e líquido intracelular.

O estresse pelo calor também levou ao acúmulo de sacarose e à diminuição de amido em folhas maduras de batata, mas não afetou a glicose. Paralelamente, a atividade da SPS aumentou significativamente (LAFTA & LORENZEN, 1995).

Em maçãs 'Fuji', o maior índice de "watercore" (uma desordem fisiológica caracterizada por aparência de encharcamento translúcido), foi associado com a mais alta concentração de sorbitol e sacarose e diminuição de glicose e frutose (BOWEN & WATKINS, 1997).

Em outro estudo realizado em tomateiro, por KELLER & STEFFEN (1995), após a aplicação do estresse mecânico (cortes de folhas) por 15 dias e armazenamento a 5-8°C/

7 dias, também observou-se uma diferença no metabolismo de carboidratos. Houve maior acúmulo de açúcares solúveis nas folhas estressadas mecanicamente, o que pode ser devido à maior atividade de biossíntese, resultante da maior eficiência fotossintética durante a refrigeração. A maior concentração de açúcares solúveis durante o resfriamento, pode ser indicativo da maior tolerância ao frio, consequência do aumento do potencial osmótico nas células, restando a água dentro destas.

Já em relação ao amido, sabe-se que normalmente a produção de fotossintatos, além do necessário, leva ao acúmulo de reservas na forma deste. Observou-se que no inverno o conteúdo de amido declina e sacarídeos exibem aumento proporcional quantitativo. Em espécies, tais como *Solanum* e *Citrus* subtropicais, ocorre o acúmulo de amido durante tratamentos a baixas temperaturas, mas somente em concordância com o acréscimo acentuado de açúcares livres (GUY *et al.*, 1992). O mesmo autor examinou a influência da temperatura baixa na atividade e síntese da SPS, a enzima de biossíntese primária da sacarose, em um esforço para esclarecer a base metabólica do acúmulo da sacarose. Foi demonstrado que a temperaturas baixas, não somente a atividade da SPS, mas também abundantes subunidades e sínteses, estavam todas aumentadas.

Craterostigma plantagineum (espécie de cactus) é o mais notável para a flutuação maciça reversível de carboidratos, durante períodos de seca ou rehidratação. O incomum açúcar 2-octulose acumula-se com o crescimento de folhas de plantas bem molhadas, mas é rapidamente convertido a sacarose quando o período de seca começa (BIANCHI *et al.*, 1991).

O acúmulo de polióis, ou metabólitos de cadeias lineares, tais como manitol e sorbitol, ou polióis cíclicos, tais como mio-inositol e seus derivados metilados, são correlacionados com a tolerância à seca e ou salinidade. Os polióis parecem funcionar de duas maneiras que são difíceis de separar mecanicamente: ajuste osmótico e osmoproteção. Em ajuste osmótico, eles atuam como osmólitos, facilitando a retenção da água no citoplasma e permitindo a sequestração de sódio no vacúolo ou apoplasto. O inositol e inositol -1-fosfato também estimulam a produção de outros compostos que têm sido correlacionados com a tolerância ao estresse, por exemplo, gomas, carboidratos

localizados na parede celular, carboidratos em glicoproteínas e mucilagens (BOHNERT *et al.*, 1995).

GOLDSTEIN & NOBEL (1994) sugeriram que o acúmulo de açúcares, inclusive o de manitol, nas células de *O. humifusa* (espécie de cactus), pode ajudar a evitar a desidratação intracelular induzida pelo congelamento, e a formação de gelo, assim como proporcionar uma proteção não coligativa para membranas e proteínas.

1.1.3. Alterações na atividade da fenilalanina-amonialase

A indução da atividade da fenilalanina-amonialase (PAL), uma das enzimas chaves no metabolismo de compostos fenólicos, tem sido considerada um mecanismo de defesa de plantas contra estresses bióticos e abióticos. A indução da PAL, entretanto, também tem sido considerada um marcador bioquímico das manchas avermelhadas em alface, uma desordem fisiológica induzida por etileno (HYODO *et al.*, 1978). Porém, em frutos de tangerina 'Fortune', MARTÍNEZ-TÉLLEZ & LAFUENTE (1997) observaram que a PAL pode ser uma resposta ao frio e que embora sua indução possa ser estimulada pelo etileno induzido pelo resfriamento, esta não parece estar relacionada à IF (depressões e manchas escuras) do flavedo dos frutos. Recentemente, foram isolados dois cDNAs que codificam para duas PALs e foi comprovado que a expressão dos mRNAs da PAL aumenta durante o armazenamento a frio, da mesma maneira que ocorre com a atividade da enzima (SÁNCHEZ-BALLESTA *et al.*, 1997).

1.1.4. O estresse oxidativo

Muitas mudanças metabólicas têm sido observadas durante prolongado resfriamento de tecidos de plantas. Proeminente entre estas são as mudanças envolvendo reações oxidativas. Estudos do aumento de fotooxidações por resfriamento, sugerem que há formação de radicais livres, levando à peroxidação de lipídeos, e que tecidos resistentes ao frio têm a habilidade para remover as espécies de oxigênios tóxicos (ativos) antes de ocorrer a peroxidação dos lipídeos (WISE & NAYLOR, 1987).

As espécies de oxigênio ativo, tais como: H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), O_2^- (superóxido), OH (radical hidroxil), e 1O_2 (oxigênio singlet) estão presentes em todas as plantas em vários graus como resultado normal de metabolismo aeróbio. O acúmulo destas espécies ativas de oxigênio pode causar prejuízos severos aos componentes

celulares, interrompendo a função metabólica (ELSTNER, 1987). Dentro de condições normais, as plantas possuem “sistemas removedores” que mantêm as espécies de oxigênio ativo abaixo dos níveis danosos (LARSON, 1988).

Quando a planta é estressada, a produção de oxigênio ativo pode exceder a capacidade dos “sistemas reparadores”, resultando em danos oxidativos (ANDERSON *et al.*, 1995). Os mesmos autores estudaram a resposta de antioxidantes à aclimação (14°C/3 dias no escuro) e resfriamento (4°C/4 dias no escuro) em tecidos de plântulas de milho, em relação à tolerância ao resfriamento e à proteção ao estresse oxidativo induzido pelo frio. Observaram que o resfriamento direto causou um acúmulo de H_2O_2 e a aclimação preveniu este acúmulo. Os níveis de glutathione elevaram-se em plântulas aclimatadas, o que pôde contribuir para o aumento da habilidade em remover H_2O_2 no coleótilo e folha. No mesocótilo (visivelmente mais susceptível ao resfriamento), a catalase 3 elevou-se em plântulas aclimatadas o que pode representar a primeira linha de defesa do H_2O_2 gerado na mitocôndria. A aclimação induziu nove das mais proeminentes isoenzimas da peroxidase, duas das quais foram localizadas na parede celular, sugerindo um papel de lignificação e, de fato, o conteúdo de lignina foi elevado em mesocótilos de plântulas aclimatadas, melhorando o mecanismo de resistência.

Nas tangerinas ‘Fortune’, MARTÍNEZ-TÉLLEZ & LAFUENTE (1997) observaram que a atividade de peroxidase dos frutos acondicionados durante 3 dias a 37°C e armazenados a frio, os quais não apresentaram danos por frio, foi superior a dos frutos armazenados diretamente sem tratamento pelo calor. SALA (1998) comprovou que a atividade da superóxido dismutase (SOD) aumentou tanto nas tangerinas sensíveis ao frio, ‘Nova’ e ‘Fortune’, como nas tolerantes ‘Clemenules’ e ‘Clementina Fina’. As atividades da catalase, ascorbato peroxidase e glutathione redutase foram superiores nos frutos das variedades tolerantes em relação a das sensíveis. Esse autor sugere, portanto, que nos cítricos o estresse oxidativo pode estar relacionado com as injúrias induzidas pelas baixas temperaturas.

O’KANE *et al.* (1996) reportaram que um experimento com aclimação de *Arabidopsis thaliana* indicou um possível papel da glutathione redutase, bem como da

ascorbato peroxidase no processo de aclimação ao frio, o qual pode envolver a minimização de possíveis efeitos prejudiciais do estresse oxidativo.

1.1.5. Alterações hormonais

1.1.5.1. Produção de etileno

Em relação à produção de etileno induzida pelo frio, esta segue o mesmo modelo geral da biossíntese do etileno: S-adenosil metionina (SAM) → ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) → etileno (YANG & HOFFMAN, 1984).

De acordo com WANG (1982), níveis de ACC, atividade de ACC sintase e produção de etileno em tecido resfriado permanecem baixos enquanto o fruto for mantido à temperatura de resfriamento, e aumenta rapidamente somente após a transferência destes para temperaturas maiores. Parece haver um estímulo na produção da codificação de mRNA para uma nova proteína durante o armazenamento a frio, mas o processo de transdução não é completado até a transferência para temperaturas maiores. Porém, foi demonstrado por JOBLING *et al.* (1991) e LELIÈVRE *et al.* (1995) que, em maçãs 'Granny Smith', a capacidade para converter ACC em etileno foi induzida mais rapidamente a baixas temperaturas (0 a 5°C) do que a 20°C. Sob refrigeração, houve indução e acúmulo de ACC oxidase e ACC sintase, em contraste com a evolução extremamente lenta do amadurecimento dos frutos. De acordo com JACKMAN *et al.* (1988), as temperaturas baixas parecem prejudicar o passo de conversão entre ACC e etileno, o que ajuda explicar a deficiência no amadurecimento normal de muitos frutos após serem armazenados por longos períodos.

Um importante aumento da produção de etileno de tangerinas 'Fortune' entre 7 e 14 dias de armazenamento a 2,5°C também foi descrito por MARTÍNEZ-TÉLLEZ & LAFUENTE (1997). Isso ocorreu imediatamente antes de aparecerem sintomas visíveis de injúria pelo frio.

1.1.5.2. Ácido abscísico

O efeito benéfico do ácido abscísico (ABA) na redução da IF tem sido descrito para muitas plantas. As aplicações exógenas de ABA a tecidos de plantas podem induzir a tolerância ao frio (RIKIN *et al.*, 1976) e ao calor (ROBERTSON *et al.*, 1994). Um estudo feito por JANOWIAK & DÖRFFLING (1996) com dez genótipos de milho,

metade deles classificada como tolerante e a outra metade como resistente ao frio, mostrou que a tolerância mais alta ao resfriamento das plântulas aclimatadas está relacionada à maior habilidade para maior e mais rápido acúmulo de ABA e melhor estabilização da água em resposta ao resfriamento. Houve evidências que a elevação em ABA foi estimulada indiretamente pela falta de água induzida pelo frio, bem como diretamente pela temperatura de resfriamento. Entretanto, em tangerinas 'Fortune', os resultados obtidos indicaram que ABA livre e ligado não parecem estar envolvidos no mecanismo adaptativo desenvolvido pelos frutos para enfrentar o estresse pelo resfriamento (LAFUENTE *et al.*, 1997). Além do que se tem comprovado que a cultivar Pinalate, deficiente em ABA, é mais tolerante ao frio que a 'Navelate', não deficiente em ABA e susceptível ao frio (ALFÉREZ *et al.*, 1996).

1.1.5.3. Poliaminas

Mudanças no conteúdo de poliaminas tem sido reportado em diferentes estresses biótico e abiótico em tecidos de plantas (FAUST & WANG, 1992). Várias evidências sugerem uma relação entre poliaminas e injúria pelo frio que varia substancialmente entre espécies. O acondicionamento de tangerinas 'Fortune' a 35°C por 3 dias reduziu consideravelmente a I.F. e aumentou o conteúdo das três poliaminas na seguinte proporção: espermina > espermidina > putrescina. Contudo, o aumento em poliaminas nos frutos induzido por tratamentos de acondicionamento a altas temperaturas, os quais aumentam a resistência ao frio, não parece estar relacionado com a indução a esta resistência (GONZÁLEZ-AGUILAR *et al.*, 1997).

Um aumento na tolerância ao congelamento da cultura *in vitro* de *Populus tremula* foi identificado quando culturas foram expostas a 10°C por pelo menos 3 dias, coincidindo com um temporário pico agudo no nível de putrescina, além do que, 3 a 15 dias de pré-tratamento a 10°C aumentou a tolerância ao congelamento, e isto pode estar de acordo com as mudanças na segunda fase de respostas do metabolismo de putrescina e espermidina (JOUVE *et al.*, 1995).

1.1.6. Proteínas de choque pelo calor

As condições do meio-ambiente que mudam a temperatura, luz, água ou balanço hormonal das plantas, levam à alterada expressão dos genes. Ao nível molecular, uma das

melhores respostas ambientais caracterizadas é a resposta à alta temperatura ou choque pelo calor. Ainda que a função das proteínas de choque pelo calor não esteja totalmente estabelecida, parecem ter um papel importante na conformação e transporte de outras proteínas celulares. Foi demonstrado que quando plântulas são deslocadas a temperaturas de cinco ou mais graus acima da temperatura ótima de crescimento, a síntese da maioria das proteínas normais e mRNA é reprimida, e a transcrição e transdução de um pequeno grupo de “proteínas de choque ao calor” (HSPs) são iniciadas. A importância das HSPs vai claramente além da sua potencial função na proteção de estresse à alta temperatura. Algumas HSPs estão presentes aos níveis significantes em células normais, não estressadas, ou são produzidas em particulares fases do ciclo da célula ou durante o desenvolvimento na ausência de estresse. Além do que, somando-se ao calor, outros tipos de estresse levam à elevada expressão de muitas HSPs, tais como: etanol, arsenito, metais pesados, aminoácidos análogos, falta de glicose etc (VIERLING, 1991).

Em trabalho de KUZNETSOV *et al.* (1993), porém, concluiu-se que o efeito protetor de curto tempo em hipertermia não foi devido às HSPs, e sim que o aumento da resistência ao sal, como resultado do choque pelo calor, pode estar conectado à rápida e intensiva liberação de etileno, acúmulo de prolina e putrescina e indução da formação *de novo* de alguns polipeptídeos de baixa massa molecular (osmotina).

LURIE *et al.* (1992) descobriram que tomates aquecidos e depois resfriados mantiveram altos níveis de mRNA para HSP70 e HSP17 por 21 dias a 2°C. Sugeriram, então, que o tratamento pelo calor induz um aumento em tomates nos níveis de mRNA e proteína de diferentes HSPs e que estes níveis permanecem altos por várias semanas a baixa temperatura. SABEHAT *et al.* (1996) e LURIE *et al.* (1996) monitoraram estreitamente as HSPs durante o tratamento pelo calor e subsequente resfriamento de tomates. Os resultados sugeriram que a persistência da presença de proteínas de choque pelo calor a baixa temperatura pode ser relevante na proteção contra a IF, proveniente do tratamento pelo calor. Observou-se que o tratamento com alta temperatura para induzir a síntese de HSP preservou a estrutura da membrana plasmática (LIN *et al.*, 1985), diminuiu o vazamento de solutos e elevou a associação da HSP15-KD com a membrana plasmática (MANSFIELD *et al.*, 1988 *apud* SABEHAT *et al.*, 1996).

1.1.7. Fatores que influenciam na injúria pelo frio

Tem-se estudado a influência de distintos fatores sobre a maior ou menor susceptibilidade dos frutos e hortaliças à injúria pelo frio. Alguns destes fatores são: tipo de espécie e variedades, estágio de maturação, condições climáticas e de cultivo, tamanho e posição dos frutos na árvore.

De acordo com CASAS (1983), as tangerinas e as laranjas toleram temperaturas mais baixas que as limas, os limões e os pomelos. Estes últimos, por exemplo, devem ser armazenados a temperaturas superiores a 10°C, enquanto que algumas variedades de laranja podem ser armazenadas entre 1 a 2°C sem problemas de alterações na casca. PRATELLA *et al.* (1969) *apud* CASAS (1983) estudaram o comportamento das variedades italianas sob conservação refrigerada, e comprovaram que as laranjas ‘Moro’ e ‘Tarocco’ são as mais sensíveis ao frio, sendo que a temperatura recomendada para a sua conservação é de 10°C. A 5°C, os danos pelo frio observados foram de 94% nas laranjas ‘Moro’ e de 63% nas ‘Tarocco’. As laranjas ‘Ovale’, ‘Valencia’ e ‘Late’ são muito menos susceptíveis ao armazenamento a 5°C, uma vez que os danos oscilam em ambas ao redor de 3%. As laranjas ‘Sanguinello’ são de sensibilidade intermediária e podem ser armazenadas a 7°C, com 14% de danos.

Goiabas colhidas em três estádios de maturidade (verde-maturo, “de vez” e madura) foram acondicionadas a 3,5, 7 e 11°C. Os frutos verde-maturos a 3,5 e 7°C, mostraram sintomas de IF. Os sintomas, que tratavam-se de depressões na casca e insuficiência para amadurecer, surgiram após a retirada dos frutos das temperaturas baixas. Estes sintomas não foram observados nos outros dois estádios de maturação (VAZQUEZ-OCHOA & COLINAS-LEON, 1990).

Um comportamento semelhante em abacates foi verificado por KOSIYACHINDA & YOUNG (1977) *apud* WANG (1982). Os abacates ‘Hass’ e ‘Fuerte’ foram menos sensíveis ao frio na fase pós-climatérica, podendo ser mantidos a 2°C por 6-7 semanas; por outro lado, as fases mais sensíveis foram durante a elevação e no pico do climatério, onde os frutos mostraram injúria após 19 dias a 2°C.

Quanto aos frutos cítricos, as observações foram diferentes. PURVIS *et al.* (1979) reportaram que os pomelos ‘Marsh’ imaturos, colhidos em julho e agosto foram mais

resistentes à IF do que os colhidos em outubro, porém a maior resistência à IF ocorreu durante a meia-estação (fevereiro-março). Enquanto que LAFUENTE *et al.* (1997) em um trabalho com tangerinas 'Fortune', publicaram que os frutos verdes foram mais tolerantes à IF, sendo que após a mudança da coloração, a susceptibilidade ao resfriamento aumentou do início de dezembro até janeiro e em fevereiro (a época mais fria durante o período de crescimento) e declinou perto de maio.

A influência da região de cultivo sobre a sensibilidade ao frio dos frutos cítricos é bem marcante, sendo que as temperaturas recomendadas para o armazenamento refrigerado de uma mesma variedade, porém de regiões distintas, são diferentes. As laranjas 'Valência' do Texas e da Flórida suportam bem as baixas temperaturas e podem ser armazenadas durante 8-10 semanas entre 0 a 1°C, com uma umidade relativa de 85-90%, sem problemas de danos pelo frio na casca. Entretanto, as laranjas da Califórnia da mesma variedade, devem ser conservadas durante 4 a 6 semanas entre 5 a 7°C, devido a sua sensibilidade ao frio (SOMOGYI & KYLE, 1978 *apud* CASAS, 1983). Para os pomelos também tem se observado diferenças; os da Flórida e do Texas podem ser conservados a 10°C durante 4-6 semanas, porém os da Califórnia e Arizona recomenda-se o armazenamento entre 14 a 15°C.

Quanto ao tamanho dos frutos, MUÑOZ-DELGADO (1961) observou que os frutos cítricos pequenos são mais susceptíveis que os grandes. Já em relação à posição dos frutos na árvore, McDONALD *et al.* (1993) fizeram um estudo com pomelos 'Marsh' colhidos da posição interior e exterior de 5 árvores, armazenados a 5°C e 80-92% de UR, por 5 semanas. Verificaram que os frutos do interior apresentaram significativamente menos danos pelo frio do que os da posição exterior, assim como as superfícies sombreadas dos frutos do exterior da árvore tiveram significativamente menos injúrias do que as superfícies expostas ao sol. Os frutos que sofreram maior incidência solar, apresentaram uma acelerada senescência e uma modificação nos compostos da cera da superfície, possivelmente levando a uma restrição nas trocas gasosas. Tais fatos estariam relacionados com uma maior sensibilidade ao frio.

1.1.8. Métodos para evitar ou minimizar as injúrias causadas pelo frio

Ao mesmo tempo que tem-se procurado entender os mecanismos que levam às injúrias pelo resfriamento, assim como os fatores que têm influência sobre eles, têm-se estudado vários métodos que possam evitar ou diminuir as injúrias causadas pelo frio, em decorrência de um aumento da tolerância ao frio, de vegetais sensíveis. Este fato seria desejável, pois possibilitaria: a) que produtos sensíveis ao resfriamento pudessem ser armazenados a temperaturas mais baixas por longos períodos, sem a perda da qualidade; b) o armazenamento misto de vegetais que possuíam antes uma exigência de temperatura incompatível; c) o tratamento de desinfestação de insetos a temperaturas baixas, com menor risco de IF

O armazenamento de cada produto hortícola em uma dada temperatura, que não seja inferior a sua correspondente Temperatura Mínima de Segurança (TMS) é a melhor forma de prevenir a ocorrência de danos provocados pelo frio. Porém, como existem vários fatores que podem influenciar na susceptibilidade dos vegetais ao frio, alterando a TMS, justifica-se a realização dos vários estudos na área.

Os principais métodos utilizados na tentativa de se evitar ou minimizar as injúrias pelo frio são os seguintes: tratamentos pelo calor, atmosfera modificada ou controlada, aquecimento intermitente, tratamentos químicos, pressão hipobárica, umidade relativa e modificações genéticas.

O pré-tratamento de frutos e hortaliças através de banhos em água quente, câmaras aquecidas, ar quente, ou simplesmente a manutenção destes à temperatura ambiente por um determinado tempo antes do armazenamento sob refrigeração, tem sido muito empregado a fim de reduzir a susceptibilidade de alguns frutos à IF.

RODOV *et al.* (1995) utilizaram o banho de água quente (53°C/ 2-3 minutos) e a cura (36°C/ 72 horas) para frutos cítricos (pomelo, limão, oroblanco e *Fortunella*) antes do armazenamento a 1 e 20°C, durante 8 semanas. O tratamento com água quente reduziu significativamente a sensibilidade de todos os frutos à injúria pelo frio, assim como a sua deterioração, demonstrando um efeito comparável ao da cura. LURIE & KLEIN (1991) preveniram o desenvolvimento da IF em tomates, mantendo-os por 3 dias a 38°C (cura) antes do armazenamento a 2°C por três semanas. A IF de tangerinas

'Fortune' também foi reduzida quando os frutos foram acondicionados por 3 dias a 37°C antes do armazenamento a 2,5°C (LAFUENTE *et al.*, 1997). Do mesmo modo, aumentou a tolerância ao frio dessa cultivar, tratando-se os frutos por imersão em banhos de água quente sob temperaturas superiores a 45°C, durante 3 ou mais minutos (GONZÁLEZ-AGUILAR *et al.*, 1997).

Para abacates, também foi utilizada a imersão em água quente (50°C/3 minutos) com 0,5% de benomyl e armazenamento a 1°C por 30 dias. JESSUP (1991) observou uma pequena evidência de IF (escurecimento vascular, polpa acinzentada ou amadurecimento irregular), tanto nos frutos que sofreram imersão como nos que não sofreram; entretanto, os que foram submetidos à imersão em solução com fungicida foram significativamente mais aceitáveis ($p < 0,05$), devido à falta de podridão causada pela antracnose. Além do que, os frutos que não foram tratados com água quente permaneceram em condições aceitáveis no estágio maduro comestível por somente 3 a 4 dias, enquanto os outros permaneceram por 7 a 8 dias.

McCOLLUM *et al.* (1995) investigaram as alterações fisiológicas de pepinos após imersão em água quente a 25, 38 ou 42°C por 30 minutos, antes do armazenamento a 12 ou 2,5°C durante duas semanas. Os pepinos que ficaram a 2,5°C tiveram um considerável aumento no vazamento eletrolítico comparados com os de 12°C, o qual diminuiu significativamente com o aumento da temperatura de imersão. Estes pepinos também apresentaram maiores taxas de produção de CO₂ e significativas quantidades de etileno com a transferência para 21°C após as duas semanas de armazenamento. A produção de etileno diminuiu com o aumento da temperatura de imersão. As hortalças mantidas a 12°C não produziram etileno após a transferência a 21°C.

LAY-YEE *et al.* (1997) também reportaram que o tratamento com água quente (47°C/90 e 120 min., 50°C/30 e 45 min., 52°C/20 e 30 min. e 54°C/20 min.) para caquis 'Fuyu' mostrou sucesso para a desinfestação e manutenção da qualidade dos frutos durante o armazenamento a frio.

Tratamentos de mangas 'Keitt' com ar quente (38°C/ 0, 24 ou 48 horas), antes do armazenamento a 5°C por 11 dias, foram realizados por McCOLLUM *et al.* (1993). Verificou-se que o efeito mais pronunciado destes tratamentos foi a redução de

depressões na casca, as quais surgiram durante o amadurecimento após a transferência à temperatura de 21°C; amadurecimento este que seguiu um modelo normal. Estes resultados indicaram que o tratamento pelo calor pode melhorar a tolerância de mangas a temperaturas baixas.

1.2. Metabolismo dos Carboidratos

As plantas para crescerem devem ser capazes de converter a energia do sol em uma forma útil. A exposição de plantas à luz estimula-as a produzir pigmentos que absorvem e utilizam a energia da luz. Em plantas superiores os produtos finais da fotossíntese são sacarose e amido ou frutanas. A sacarose é a maior forma na qual o carbono do dióxido de carbono é assimilado para transporte através da planta, e amido e frutanas são as maiores formas nas quais o carbono é armazenado. O amido é formado nos cloroplastos e amiloplastos, a sacarose, no citoplasma, e quando as frutanas são os compostos de armazenamento em folhas de certas gramíneas, sua síntese é no vacúolo. A utilização destes compostos na respiração, leva à produção de energia e esqueletos de carbono para biossínteses. Os produtos da fotossíntese são convertidos a piruvato ou malato, os quais podem entrar na mitocôndria para os estágios finais de oxidação para dióxido de carbono, via ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Em alguma fase durante sua oxidação, compostos intermediários podem ser retirados e entrar em modelos de sínteses de proteínas, lipídeos e parede celular (BRYCE & HILL, 1993).

1.2.1. Respiração, desenvolvimento e amadurecimento dos frutos

Os dois maiores substratos respiratórios em frutos, originados dos assimilatos fotossintéticos, são os açúcares (frutose, glicose e sacarose são os mais comuns) e ácidos orgânicos (principalmente malato e citrato). Ambos são encontrados sequestrados dentro do vacúolo. O quociente respiratório em frutos varia, mas está normalmente na faixa de 1, indicando que açúcares são os substratos respiratórios predominantes. Entretanto, em muitos momentos, parece que o metabolismo de ácidos orgânicos pode ocorrer a uma proporção significativa na respiração. Os modelos respiratórios utilizados pelos frutos para a oxidação dos açúcares são aqueles comuns a todos os tecidos das plantas, chamados

glicólise, modelo oxidativo fosfato pentose (OPP) e o modelo dos ácidos tricarboxílicos - TCA (TUCKER & GRIERSON, 1987).

Os frutos verdes são capazes de realizar fotossíntese, mas isto é limitado e a maioria dos assimilatos provém de outras partes da planta. Entretanto, os frutos diferem em como esses assimilatos são acumulados durante o desenvolvimento e amadurecimento. Alguns frutos acumulam o total de seus carboidratos antes do início do amadurecimento. Estas diferenças não são importantes para a respiração, a qual utiliza relativamente pouco do assimilato, mas são de grande importância para as considerações de “flavor”. O amadurecimento requer a síntese de novas proteínas e mRNA, bem como, novos pigmentos e compostos de “flavor”. Estes processos anabólicos requerem energia e um suprimento de blocos de esqueletos de carbono, os quais são obtidos em frutos, assim como em outros tecidos, pela respiração. Os frutos em geral podem ser classificados em climatéricos ou não climatéricos, com base no seu modelo respiratório durante o amadurecimento. Frutos climatéricos possuem um pico característico da atividade respiratória durante o amadurecimento, denominado de climatério respiratório. Este pico pode corresponder ao ótimo amadurecimento comestível, ou pode preceder ou ser posterior a essa fase, de acordo com o fruto em questão. A magnitude do pico também pode variar enormemente entre os frutos. Em contraste, frutos não-climatéricos, simplesmente exibem um gradual declínio na sua respiração durante o amadurecimento. Entretanto, ainda há marcantes diferenças entre os frutos observando-se a magnitude de sua taxa respiratória. Tanto para frutos climatéricos como não climatéricos, existe a correlação geral entre alta taxa respiratória e curto tempo de vida (TUCKER, 1996).

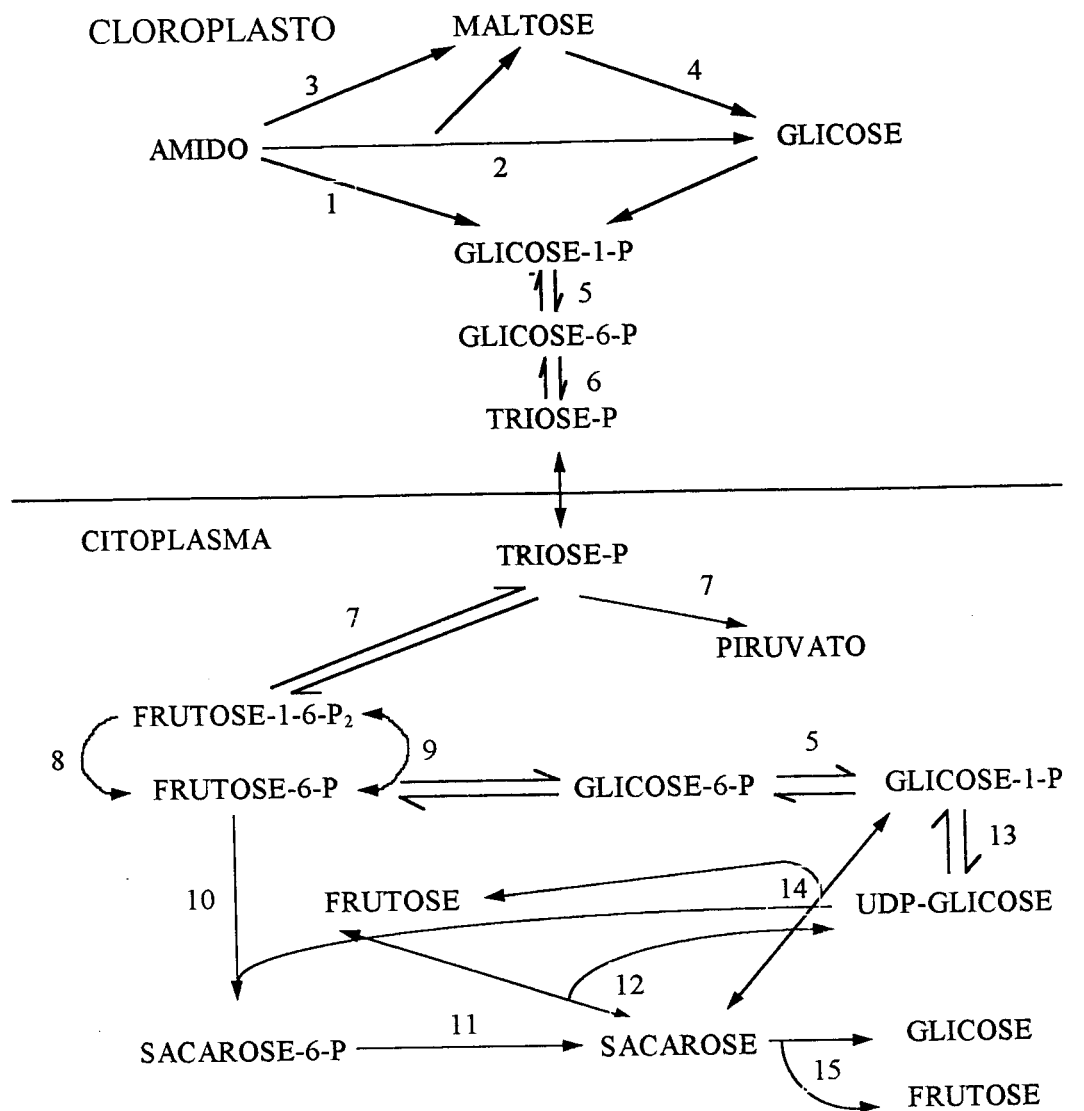
De acordo com ULRICH (1970), em geral, níveis de ácidos declinam durante o amadurecimento, presumivelmente devido à sua utilização como substrato respiratório. WHITING (1970) relata que durante o amadurecimento os níveis de açúcares dentro do fruto tendem a aumentar, devido ao aumento da importação de açúcar da planta, ou da mobilização das reservas de amido dentro do fruto, dependendo do tipo de fruto e se ele está amadurecendo na planta ou não. Os frutos separados da planta mãe possuem um sistema isolado no qual o carbono externo não é translocado e a perda do carbono somente ocorre como voláteis, os quais podem quase completamente originar-se do CO₂

respiratório. Comparada com a interconversão do amido a açúcares e CO₂ durante o amadurecimento, a síntese ou degradação de vários outros constituintes (por exemplo, ácidos orgânicos, voláteis aromáticos, lipídeos, proteínas, celulose, lignina e pectina) representa um investimento mínimo de carboidrato (PALMER, 1971).

1.2.2. Mobilização do amido

Para TUCKER (1996), em muitos frutos, a quebra do amido a glicose, frutose ou sacarose é uma característica do evento de amadurecimento. Todas as três enzimas de degradação do amido (α e β -amilase e amido fosforilase) têm sido identificadas em frutos. As três enzimas ocorrem em várias formas de isoenzimas e as suas atividades aumentam durante o amadurecimento. Estas enzimas são ativas somente contra as cadeias de glicose da amilose, a porção linear do amido. Porém, as enzimas que atacam a amilopectina, porção ramificada do amido, têm sido identificadas em vários tecidos, incluindo os do fruto banana. Os produtos finais da degradação do amido são glicose e ou glicose-1-fosfato. Podem ser convertidos a glicose-6-fosfato pela ação da hexoquinase ou glicose fosfato mutase, respectivamente. Desde que o amido é confinado nos plastídeos das células dos frutos, a degradação também ocorre nestes compartimentos.

Dentro dos amiloplastos, o amido ainda é hidrolisado em trioses fosfato, as quais prontamente se difundem através do “envelope” do amiloplasto para o citoplasma. É possível que em alguns casos a exportação dos produtos de degradação do amido possa ocorrer através do transporte de hexoses fosfato. A maior utilização dos produtos da quebra do amido ocorre no citoplasma. Uma vez no citoplasma, os produtos da quebra predominantemente entram no modelo de Embden-Meyerhof-Parnas, para serem utilizados na respiração com formação de CO₂ (glicólise), ou para serem utilizados na gluconeogênese, ou seja, na síntese da sacarose e outros açúcares (Figura 1 - Fonte: TUCKER, 1996).



1- amido fosforilase

2- α -amilase

3- β -amilase

4- α -glicosidase

5- glicose fosfato mutase

6- triose fosfato/posfato transportador

7- glicose/gluconeogênese

8- frutose bifosfatase

9- fosfofrutofosfotransferase

10- sacarose fosfato sintetase

11- sacarose fosfato fosfatase

12- sacarose sintase

13- UDP-glicose pirofosforilase

14- sacarose fosforilase

15- invertase

Figura 1. Degradação do amido e síntese da sacarose.

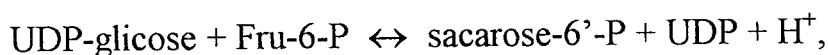
A interconversão enzimática de frutose-1,6-bifosfato e frutose-6-fosfato parece ser o mais provável sítio de controle glicolítico durante o amadurecimento do fruto e pode ser responsável pela regulação deste movimento bidirecional do carbono. No amadurecimento de bananas, o pico na relação da frutose-1,6-bifosfato para a frutose-6-fosfato no 2º dia indicou um maior aumento na promoção glicolítica ou inibição gluconeogênica (BEAUDRY *et al.*, 1989).

Foi demonstrado por BATZ *et al.* (1995) que cloroplastos purificados de pimentas verdes utilizaram glicose-6-fosfato exógena como um precursor para a biossíntese de amido. Em adição à síntese de amido, a maior parte destes plastídeos possuem a habilidade de oxidar carboidratos, uma vez que eles contêm as enzimas necessárias para operar o OPP. Em trabalho também com pimentas verdes, THOM & NEUHAUS (1995) verificaram que aumentando a concentração exógena de glicose-6-fosfato houve uma inibição significativa da taxa de mobilização do amido, indicando que o amido serve como uma reserva para suprir os plastídeos dos frutos com carboidratos necessários às reações anabólica e catabólica (como por exemplo, síntese de carotenóides e degradação de clorofila, respectivamente), nas condições em que o total de carboidratos citosólico é baixo.

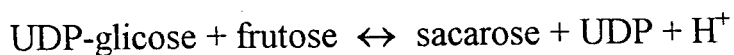
1.2.3. Síntese e hidrólise da sacarose

Há uma grande evidência que os processos de síntese e hidrólise da sacarose interagem e que, dentro das condições normais, freqüentemente há um apreciável “turnover” da sacarose.

A síntese da sacarose em plantas superiores pode ser catalisada por duas distintas enzimas, a sacarose fosfato sintase (SPS):



e sacarose sintase (SS):



Ambas as enzimas são solúveis no citoplasma e catalisam livremente reações reversíveis. Entretanto, a rápida remoção da sacarose-6'-P pela sacarose fosfatase (SPP), mantém baixa a sacarose-P citosólica e, desse modo, confere uma reação essencialmente irreversível à SPS. Portanto, a síntese da sacarose é geralmente considerada por ser

catalisada pela SPS em conjunção com a SPP, enquanto que a hidrólise da sacarose é extensamente catalisada pela SS. Embora um dado tecido tenderá a ter um excesso de uma atividade sobre a outra, dependendo se ele está engajado na síntese ou hidrólise da sacarose, muitos tecidos possuem as duas enzimas, e também está claro que pode ocorrer um considerável “ciclo do açúcar”. Este se trata de um significativo “turnover” da sacarose endógena em células heterotróficas; ocorrendo, portanto, também, a síntese da sacarose nestas células que, normalmente, estão engajadas na degradação da sacarose (HUBER & HUBER, 1996). Este fato tem sido identificado em uma variedade de tecidos, incluindo pêssegos (MORIGUCHI *et al.*, 1990) e na cultura de células de laranjas ‘Hamlin’ (VU *et al.*, 1995).

Com respeito à localização, agora está claro que a SPS não está confinada a tecidos fotossintetizantes, mas também ocorre em tecidos não fotossintetizantes que são ativos na biossíntese da sacarose, como por exemplo, no amadurecimento de frutos (HUBER & HUBER, 1996).

Em um estudo sobre o comportamento da SPS no amadurecimento de bananas, NASCIMENTO (1997) reportou que uma seqüência parcial do gene da SPS foi amplificado através de PCR, clonado, e o seu sequenciamento indicou que a enzima de banana apresenta elevada homologia com as de outras fontes vegetais. A análise dos níveis de proteína e mRNA durante o desenvolvimento e amadurecimento do fruto permitem correlacionar o aumento de atividade com o aumento na expressão do gene da SPS. NASCIMENTO *et al.* (1997) relacionaram as mudanças da atividade de SPS e acúmulo de sacarose, e observaram uma melhor associação de ambas no final da fase de acúmulo do amido do que no início do período climatérico.

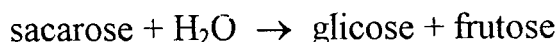
A atividade da SPS parece ser regulada por dois mecanismos distintos. O primeiro é denominado “controle fino” e consiste na regulação alostérica por ativadores e inibidores. DOEHLERT & HUBER (1983) verificaram que a SPS da folha de espinafre é ativada por glicose-6-fosfato, aumentando a V_{max} e a afinidade por frutose-6-fosfato. Essa ativação por glicose-6-fosfato é antagonizada por fosfato inorgânico (Pi), que atuaria como inibidor parcial competitivo, sendo a inibição dependente do pH como função da concentração de íon fosfato dibásico. Os autores sugerem que a regulação da

atividade se dá pela razão glicose-6-fosfato/Pi e que o acúmulo de Pi sinaliza uma redução no suprimento de hexoses-fosfato. O outro mecanismo de regulação consiste em mudanças na atividade decorrentes de alteração das propriedades cinéticas através de modificação covalente por fosforilação reversível ou alteração nos níveis de proteína SPS. O controle por fosforilação atuaria principalmente para ajuste da atividade às variações metabólicas impostas pelo ciclo claro-escuro em tecidos fotossintetizantes.

De acordo com KRUGER (1997), as plantas possuem dois tipos de enzimas capazes de hidrolisar a sacarose. Uma delas é a sacarose sintase, que catalisa prontamente a reação reversível:



Evidências sugerem que para uma grande classe de tecidos esta enzima está confinada no citosol. O outro tipo de enzima é a invertase, que catalisa essencialmente a hidrólise irreversível da sacarose a glicose e frutose:



As invertases ácida e alcalina estão presentes em plantas e são distinguidas por terem pH ótimo de cerca de 5,0 e 7,5, respectivamente. A invertase ácida se encontra em vacúolos e está associada com paredes celulares de plantas, enquanto que a invertase alcalina está provavelmente restrita ao citosol.

1.3. Parede Celular

Quando consideramos paredes celulares de vegetais comestíveis, o tipo de parede que é de maior interesse é a parede celular primária. A parede celular secundária está ausente em muitos frutos (NELMES & PRESTON, 1968) e a presença de alguma apreciável quantidade em vegetais, geralmente os torna muito consistentes e fibrosos para serem atrativos como alimento humano.

1.3.1. Constituintes da parede celular

Em um resumo de numerosos estudos (ALBERSHEIM, 1974), pode-se dizer que a parede celular é constituída de fibrilas de celulose embebidas em uma matriz composta de substâncias pécticas, hemiceluloses, proteínas, ligninas, solutos de baixo peso molecular e água.

Segundo VAN BUREN (1979), em uma simplificada compreensão, a celulose tem a função de dar rigidez e resistência ao rompimento, enquanto as substâncias pécticas e hemicelulose conferem plasticidade e habilidade ao estiramento. A lamela média pode ser considerada uma extensão do material da matriz da parede celular primária, com exceção das fibrilas de celulose. Como é a porção mais externa da célula da planta, ela possui o papel primário de adesão intercelular.

Na Tabela 1 (BRETT & WALDRON, 1990) estão relacionados os componentes da parede, porém nem todos os constituintes descritos da matriz estão presentes em todas as paredes celulares das plantas.

FASE	COMPONENTES	
Microfibrilar	Celulose (β 1,4-glucana)	
Matriz	Pectinas	ramnogalacturonana I
		arabinana
		galactana
		arabinogalactana I
		homogalacturonana
		ramnogalacturonana II
	Hemiceluloses	xilana
		glucomanana
		manana
		galactomanana
		glucuronomanana
		xiloglucana
		calose (β 1,3-glucana)
		β 1,3-, β 1,4-glucana
		arabinogalactana II
		Proteínas
	arabinogalactana-proteína	
	outras, incluindo enzimas	
	Fenólicos	lignina
		ácido ferúlico
		outros, por ex. ácido cumárico, ácido truxílico

Tabela 1 - Componentes da parede celular

A celulose é uma β 1,4-glucana não ramificada. O grau de polimerização é ao redor de 15000 (número de resíduos de açúcares por molécula). Cerca de 30 a 100 moléculas de celulose situam-se lado a lado formando a microfibrila. As finas e extremamente longas microfibrilas compõem a fase microfibrilar.

As pectinas são conhecidas por possuírem um esqueleto de ramnogalacturonana, na qual cadeias α -D-galacturonanas unidas por ligações 1-4 são interrompidas por dobras resultantes dos resíduos L-ramnopiranosil, que sustentam cadeias laterais neutras consistindo basicamente de L-arabinose, D-galactose e D-xilose (SAULNIER & BRILLOUET, 1988). Estas cadeias laterais de açúcares neutros tendem a formar blocos que resultam em regiões ramificadas e ligam pectinas com hemiceluloses (DE VRIES *et al.* 1982).

1.3.2. Variações dos constituintes da parede celular durante o desenvolvimento e amadurecimento dos frutos

Os componentes da parede celular e lamela média passam por significantes variações estruturais durante o desenvolvimento e amadurecimento dos frutos, variando entre as espécies, variedades e tipos de tratamentos aplicados aos frutos.

CUTILLAS-ITURRALDE *et al.* (1993 e 1994) avaliaram as mudanças na parede celular de caquis durante o desenvolvimento e descobriram que a quantidade de polissacarídeos pécticos diminuiu todo o tempo. Eles também verificaram que a hemicelulose, incluindo a xiloglucana, diminuiu durante o desenvolvimento e que isto foi acompanhado por um aumento no perfil do peso molecular de xiloglucana. PERCY *et al.* (1997) observaram que durante o desenvolvimento de maçãs, no período de mais lento crescimento (após um período de rápida expansão), este foi caracterizado por somente um pequeno aumento no tamanho do fruto e uma diminuição do material da parede celular, o que pode ser devido a um aumento no tamanho celular e ao desenvolvimento de ar nos espaços intracelulares dos frutos. As hemiceluloses em maçãs não diminuíram em peso molecular durante a expansão dos frutos. Em morangos, os polissacarídeos da parede celular aumentaram cerca de dez vezes durante o desenvolvimento do fruto (acima de 21 dias), após o qual eles permaneceram constantes ou diminuíram (KNEE *et al.*, 1977).

McCOLLUM *et al.* (1989) relataram que a perda da firmeza durante o amadurecimento de melões ‘Galia’ foi relacionada a um aumento na solubilidade e uma diminuição no tamanho molecular de poliuronídeos, assim como uma redução no tamanho molecular de hemiceluloses, acompanhada por mudanças na composição de açúcares neutros não-celulósicos. SIMANDJUNTAK *et al.* (1996) observaram que o total de ácidos urônicos não mudou com a maturidade em melões ‘Honey Dew’ e diminuiu para os ‘Cantaloupe’ no estágio maturo-“todo maturo”. A diminuição em ramnose, arabinose, manose e galactose sugeriu que a pectina e hemicelulose foram modificadas e solubilizadas com o aumento da maturidade.

O amaciamento de mangas durante o amadurecimento foi acompanhado por um rápido declínio na quantidade de sólidos insolúveis em etanol (SIE). Segundo ROE & BRUEMMER (1981) a maior parte desta diminuição pode ser explicada pela conversão de amido do SIE em açúcares solúveis. Além disso, a conversão de substâncias pécticas a compostos solúveis em etanol também refletiu na diminuição do SIE. O teor de pectina total diminuiu e a distribuição de substâncias pécticas no SIE também mudou durante o amadurecimento, uma vez que a pectina solúvel em água e álcali declinou e a pectina solúvel em oxalato de amônia aumentou.

MANGAS *et al.* (1992) reportaram, igualmente, uma diminuição do SIE com o amadurecimento de maçãs, sendo que, no último estágio deste, as frações de pectina solúvel em água e quelator (oxalato de amônia) aumentaram e a fração solúvel em ácido diminuiu. Para pêssegos (SHEWFELT *et al.*, 1971) e tomates (MALIS-ARAD *et al.*, 1983), os autores relacionaram a perda da firmeza durante o avanço da maturação, com o aumento do conteúdo do ácido pectínico (fração da pectina solúvel em água) e a diminuição da protopectina (solúvel em ácido clorídrico). Nos pêssegos, a fração de ácido péctico (solúvel em oxalato de amônia) não apresentou nenhum modelo característico de mudança.

Em frutos cítricos, durante a maturação, geralmente as mudanças em pectinas nos tecidos meristemático e parenquimatosos resultam em um declínio da pectina insolúvel em água e altamente metilada, segue-se um aumento e então um novo declínio em pectinas solúveis e pectinatos (pectina livre de metil), tal o progresso do fruto no estágio “todo

maturo”. Os níveis de pectina total de flavedo e albedo aumentam nos estádios iniciais de crescimento, diminui em base de sólidos totais durante a maturação, e aumenta novamente durante o armazenamento (SINCLAIR & JOLLIFFE, 1961; ROUSE, 1977 *apud* BALDWIN, 1996). Em relação ao grau de metilação em cascas de laranjas, durante o amadurecimento, este elevou-se em cerca de 80%, de acordo com os dois primeiros autores citados anteriormente, e não mudou ou diminuiu ligeiramente para o terceiro autor.

1.3.3. Grau de metil esterificação

A alta proporção de ácido galacturônico na maior parte das pectinas dos vegetais confere um caráter altamente ácido aos polissacarídeos facilitando as interações iônicas com o cálcio. Os vegetais alteram seu caráter ácido pela adição ou remoção de metil ésteres dos resíduos de ácido galacturônico. O grau de metil esterificação varia entre os tecidos e estádios de desenvolvimento. Uma das maiores funções da pectina em plantas é a coesão entre células através de numerosas ligações cruzadas de cálcio entre moléculas adjacentes de pectina. A metil esterificação aparentemente limita a habilidade da pectina para formar ligações cruzadas de cálcio, devido à alteração da distribuição da carga da molécula (MANESS *et al.*, 1990).

O armazenamento de nectarinas a 0°C levou a um grau mais baixo de esterificação do que em frutos armazenados sob atmosfera controlada na mesma temperatura. Porém, durante o amadurecimento destes frutos a 20°C, o grau de esterificação aumentou, inclusive nos frutos que permaneceram por todo o tempo nesta temperatura, ou naqueles que desenvolveram a injúria pelo frio. Isto pode ser devido a uma seletiva clivagem dos ácidos urônicos das áreas não esterificadas, permitindo que os polímeros com um alto grau de esterificação permanecessem (LURIE *et al.*, 1994).

Em trabalho com tomates, STEELE *et al.* (1997) reportaram que a de-esterificação do esqueleto de ácido galacturônico pela pectinametilesterase facilita a despolimerização de pectinas pela poligalacturonase II (PGII). A análise por “Western blots” dos géis de poliacrilamida de eletroforese, com um anti-soro anti-PGII, demonstrou que a expressão da PGII está relacionada ao amadurecimento.

1.3.4. Alteração da atividade enzimática pelo frio e calor

MARANGONI *et al.* (1995) descreveram que o amaciamento de tomates não refrigerados correlacionou-se com a atividade de PGI, enquanto que o amaciamento associado ao resfriamento correlacionou-se com uma atividade mais alta de pectinametilesterase (PME). Os autores sugeriram que a perda de turgor associada com uma aumentada absorção de água ou inchaço da parede celular modificada pela PME foram responsáveis pelo amaciamento como uma consequência do resfriamento.

O armazenamento de mangas a 5°C e depois transferidas a 20°C para amadurecerem, segundo ZAUBERMAN *et al.* (1988), resultou na elevação das atividades de peroxidase e celulase da casca, durante o desenvolvimento da injúria pelo frio.

De acordo com MERCER & SMITTLE (1992), a solubilização de poliuronídeos da parede celular de pepinos foi associada com o desenvolvimento de sintomas de injúria pelo frio. Houve uma variação em 70% de pectinatos de baixo metoxil na injúria pelo frio.

Tomates mantidos por 4 dias a 34°C apresentaram, neste período, um contínuo acúmulo de proteínas e atividades de PG e PME, mas depois disto a PG declinou e houve pequena alteração da PME. A expressão de genes da PG foi gradualmente e irreversivelmente perdida durante o estresse pelo calor, enquanto a da PME se apresentou muito menos sensível (KAGAN-ZUR *et al.*, 1995).

A PME foi encontrada na casca, membranas e vesículas de sucos de laranja, sendo que em vesículas de suco ela foi mais ativa e mostrou um aumento na atividade durante o amadurecimento (ROUSE, 1977 *apud* BALDWIN, 1996). Durante a maturação de tangerinas ‘Satsuma’, a atividade da celulase diminuiu no albedo e ocorreu em um menor grau no flavedo de frutos maduros (KURAOKA *et al.*, 1975).

1.3.5. Síntese de parede celular durante o amadurecimento e armazenamento

MITCHAM *et al.* (1989) verificaram que a síntese de parede celular continuou a taxas relativamente altas durante o amadurecimento de tomates, mesmo com uma diminuição do peso seco da parede. A síntese e inserção de um polímero modificado com remoção de outros polímeros, pode produzir uma parede celular menos rígida e permitir o amaciamento do tecido durante o amadurecimento. GREVE & LABAVITCH (1991), utilizando D-[U-¹³C] glicose, identificaram mudanças específicas na biossíntese da parede

celular no amadurecimento do pericarpo de tomates, incluindo um aumento na incorporação de resíduos de xilosil e manosil hemicelulósicos e diminuição na incorporação de resíduos galactosil em pectina solúvel em quelante.

GRANT *et al.* (1992) observaram que ocorreu síntese de parede celular e seus monossacarídeos em caquis armazenados por 8 semanas a 0°C. Ao mesmo tempo, o grau de solubilização da parede celular (polímeros pécticos e hemicelulósicos) foi maior e o processo foi mais acelerado em frutos injuriados pelo frio. Os autores especularam que a manifestação física primária da desordem pelo frio, a gelatinização do tecido, pode ser uma consequência da síntese de polímeros adicionais da parede celular durante prolongado armazenamento a 0°C, e de uma acelerada dissolução da parede quando os caquis foram transferidos para 20°C.

O pré-tratamento de maçãs 'Golden Delicious' por 4 dias a 38°C resultou em uma diminuição do conteúdo de arabinose e galactose da parede celular, porém com nenhuma diminuição de ácidos urônicos. Ao contrário, houve um ligeiro aumento no conteúdo total de ácidos urônicos durante os 5 meses de armazenamento a 0°C, o qual pode ser indicativo de nova síntese da parede celular (SHALOM *et al.*, 1993).

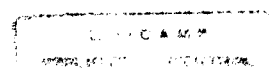
1.4. Referências Bibliográficas

01. AGRIANUAL - Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira. FNP-Consultoria & Comércio / M & S (Mendes & Scotoni), 1998.
02. ALBERSHEIM, P. The primary cell wall and central control of elongation growth. In: **Plant Carbohydrate Chemistry**, London: (J. B. Pridham, ed), Academic Press, 1974.
03. ALFÉREZ, F.; MULAS, M.; LAFUENTE, M. T.; ZACARÍAS, L. Comportamento postcosecha de um mutante de la naranja 'Navelate' deficiente en ácido abscísico. **IV Simpósio Nacional, I Ibérico, sobre Maduración y Post-recolección de Frutos y Hortalizas**. Valencia. Septiembre, p.55-58, 1996.
04. ANDERSON, M. D.; PRASAD T. K.; STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, p.1247-1257, 1995.

05. BALDWIN, E. A. Citrus fruit. In: Seymour, G. B.; Taylor, J. E.; Tucker, G. A. **Biochemistry of Fruit Ripening**. 2ª ed. London: Chapman & Hall, 1996. cap 4: p.107-137.
06. BATZ, O.; SCHEIBE, R.; NEUHAUS, H. E. Purification of chloroplasts from fruits of green-pepper (*Capsicum annuum* L.) and characterization of starch synthesis. Evidence for a functional hexose-phosphate translocator. **Planta**, v.196, p.50-57, 1995.
07. BEAUDRY, R. M.; SEVERSON, R. F.; BLACK, C. C.; KAYS, S. J. Banana ripening: implications of changes in glycolytic intermediate concentrations glycolytic and gluconeogenic carbon flux, and fructose 2,6-bisphosphate concentration. **Plant Physiology**, v.91, p.1436-1444, 1989.
08. BERGEVIN, M.; L'HEUREUX, G. P.; THOMPSON, J. E.; WILLEMOT, C. Effect of chilling and subsequent storage at 20°C on electrolyte leakage and phospholipid fatty acid composition of tomato pericarp. **Physiologia Plantarum**, v.87, p.522-527, 1993.
09. BIANCHI, G.; MURELLI, C.; SOLAMINI, F.; BARTELS, D. Novel carbohydrate-metabolism in the resurrection plant, *Craterostigma plantagineum*. **Plant Journal**, v.3, p.355-359, 1991.
10. BOHNERT, H. J.; NELSON, D. E.; JENSEN, R. G. Adaptations to environmental stresses. **The Plant Cell**, v.7, p.1099-1111, 1995.
11. BOWEN, J. H.; WATKINS, C. B. Fruit maturity, carbohydrate and mineral content relationships with watercore in 'Fuji' apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 11, p.31-38, 1997.
12. BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Wall**. 1ªed. London: Unwin Hyman Inc., 1990, 194p.
13. BRYCE, J. H.; HILL, S. A; Energy production en plant cells. IN: Lea, P. J.; Leegood, R. C. **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. London: John Wiley & Sons, 1993, cap.1: p.1-26.
14. CASAS, A. Alteraciones fisiológicas en la corteza de los frutos cítricos ocasionadas por el frío, en el almacenamiento y en el transporte refrigerados. **Revista de Agroquímica y tecnología de Alimentos**, v.23, n.3, p.321-336, 1983.
15. CHITARRA, M. I. F. & CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras, ESAL/FAEPE, 1990. 320p.

16. CLARKSON, D. T., HALL, K. C., ROBERTS, K. M. Phospholipid composition and fatty acid desaturation in the root of rye during acclimatization of low temperature. **Planta**, v.149, p.469-471, 1980.
17. CUTILLAS-ITURRALDE, A; ZARRA, I.; FRY, S. C.; LORENCES, E. P. Implication of persimmon fruit hemicellulose metabolism in the softening process. Importance of xyloglucan endotransglycosylase. **Physiologia Plantarum**, v.91, p.169-176, 1994.
18. CUTILLAS-ITURRALDE, A; ZARRA, I.; LORENCES, E. P. Metabolism of cell wall polysaccharides from persimmon fruit. Pectin solubilization during fruit ripening occurs in apparent absence of polygalacturonase activity. **Physiologia Plantarum**, v.89, p.369-375, 1993.
19. DE VRIES, J. A; ROMBOUTS, F. M.; VORAGEN, G. J.; PILNIK, W. Enzymic degradation of apple pectins. **Carbohydrate Polymers**, v.2, p.25-33, 1982.
20. DOEHLERT, D. C.; HUBER, S. C. Regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase by glucose-6 phosphate, inorganic phosphate and pH. **Plant Physiology**, v.73, p.989-994, 1983.
21. ELSTNER, E. F. Metabolism of activated oxygen species. IN: Davies, D. D., **Biochemistry of metabolism: The Biochemistry of Plants**, New York: Academic press, 1987, vol.11, p.253-315.
22. FAUST, M.; WANG, C. Y. Polyamines in horticulturally important plants. **Horticultural Review**, v.14, p.333-356, 1992.
23. GOLDSTEIN, G. & NOBEL, P. S. Water relations and low-temperature acclimation for cactus species varying in freezing tolerance. **Plant Physiology**, Washington, v.104, p.675-681, 1994.
24. GONZÁLEZ-AGUILAR, G.; ZACARIAS, L.; MULAS, M.; LAFUENTE, M. T.; Hot water dips influence on chilling injury, decay and polyamine content of 'Fortune' mandarins. **Postharvest Biology and Technology**, v.12, p.61-69, 1997.
25. GRANT, T. M.; MACRAE, E. A; REDGWELL, R. J. Effect of chilling injury on physicochemical properties of persimmon cell walls. **Phytochemistry**, v.31, n.11, p.3739-3744, 1992.
26. GREVE, L. C.; LABAVITCH, J. M. Cell wall metabolism in ripening fruit. V. Analysis of cell wall synthesis in ripening tomato pericarp tissue using a D-[U-¹³C]glucose tracer and gas chromatography-mass spectrometry. **Plant Physiology**, v.97, p.1456-1461, 1991.

27. GUY, C. L.; HUBER, J. L. A; HUBER, S. C. Sucrose phosphate syntase and sucrose accumulation at low temperature. **Plant Physiology**, Washington, v.100, p.502-508, 1992.
28. HUBER, S. C.; HUBER, J. L. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p.431-444, 1996.
29. HURRY, V. M.; MALMBERG, G.; GARDESTROM, P.; OQUIST, G. Effects of a short-term shift to low temperature and of long-term cold hardening on photosynthesis and ribulose-1,5-biphosphate carboxylase / oxygenase and sucrose phosphate synthase activity in leaves of winter rye (*Scale cereale* L.). **Plant Physiology**, v.106, p.983-990, 1994.
30. HURRY, V. M.; STRAND, A; TOBIAESON, M.; GARDESTROM, P.; OQUIST, G. Cold hardening of spring and winter wheat and rape results in differential effects on growth, carbon metabolism, and carbohydrate content. **Plant Physiology**, v.109, p.697-706, 1995.
31. HYODO, H.; KURODA, H. ; YANG, S. F. Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. **Plant Physiology**, v.62, p.31-35, 1978.
32. JACKMAN, R. L; YADA, R; Y.; MARANGONI, A; PARKIN, K. L.; STANLEY, D. W. Chilling injury. A review of quality aspects. **Journal of Food Quality**, v.11, p.253-278, 1988.
33. JANOWIAK, F.; DÖRFFLING, K. Chilling of maize seedlings: changes in water status and abscisic acid content in ten genotypes differing in chilling tolerance. **Journal Plant Physiology**, v.147, p.582-588, 1996.
34. JESSUP, A. J. High-temperature dip and low temperatures for storage and disinfestation of avocados. **HortScience**, v.26, n.11, p.1420, 1991.
35. JOBLING, J.; McGLASSON, W. B.; DILLEY, D. R.; Introduction of ethylene synthesizing competency in Grammy Smith aples by exposure to low temperature in air. **Postharvest Biology and Technology**, v.1, p.111-118, 1991.
36. JOUVE, L.; FOUCHÉ, J. G.; GASPAR, T. Early biochemical changes during acclimation of poplar to low temperature. **Journal Plant Physiology**, v.147, p.247-250, 1995.



37. KAGAN-ZUR, V.; TIEMAN, D. M.; MARLOW, S. J.; HANDA, A. K. Differential regulation of polygalacturonase and pectinmethylesterase gene expression during and after heat stress in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits. **Plant Molecular Biology**, v.29, p.1101-1110, 1995.
38. KELLER, E. & STEFFEN, K. L. Increased chilling tolerance and altered carbon metabolism in tomato leaves following application of mechanical stress". **Physiologia Plantarum**, v.93, p.519-25, 1995.
39. KNEE, M.; SARGENT, J. A.; OSBORNE, D. J. Cell wall metabolism in developing strawberry fruits. **Journal of Experimental Botany**, v.28, n.103, p.337-396, 1977.
40. KRUGER, N. J. Carbohydrate synthesis and degradation. IN: Dennis, D. T.; Turpin, D. H.; Lefebvre, D. D.; Layzell, D. B. **Plant Metabolism**. 2^aed. Harlow: Longman, 1997. Cap2: p.83-104.
41. KURAOKA, T.; IWASAKI, K.; TSUJI, H. Studies on the peel puffing of the Satsuma mandarin. II. Changes of cell morphology and cellulase activity during the development of the fruit rind. **Journal Japanese Society of Horticultural Science**, v.44, p.7-14, 1975.
42. KUZNETSOV, V. V.; RAKITIN, V. Y.; BORISOVA, N. N.; ROTSCHUPKIN, B. V. Why does heat shock increase salt resistance in cotton plants? **Plant Physiology Biochemistry**, v.31, n.2, p.181-188, 1993.
43. LAFTA, A. M.; LORENZEN, J. H. Effect of high temperature on plant growth and carbohydrate metabolism in potato. **Plant Physiology**, v.109, p.637-643, 1995.
44. LAFUENTE, M. T.; MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. A.; ZACARÍAS, L. Absciscic acid in the response of 'Fortune' mandarins to chilling. Effect of maturity and high-temperature conditioning. **Journal Science of Food Agricultural**, v.73, p.494-502, 1997.
45. LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v.27, p.969-978, 1988.
46. LAY-YEE, M.; BALL, S.; FORBES, S. K.; WOOLF, A. B. Hot-water treatment for insect disinfestation and reduction of chilling of 'Fuyu' persimmon. **Postharvest Biology and Technology**, v.10, p. 81-87, 1997.
47. LELIÈVRE, J.-M.; TICHIT, L.; FILLION, L.; LARRIGAUDIÈRE, C.; VENDRELL, M.; PECH, J.-C. Cold-induced accumulation of 1-aminocyclopropane 1-carboxylate oxidase protein in Granny Smith apples. **Postharvest Biology and Technology**, v.5, p.11-17, 1995.

48. LEVITT, J. **Response of plants to environmental stresses**. New York: Academic Press, 1972.
49. LIN, C. Y.; CHEN, Y. M.; KEY, J. L. Solute leakage in soybean seedlings under various heat shock regimes. **Plant Cell Physiology**, v.26, p.1493-1498, 1985.
50. LURIE, S.; HANDROS, A.; FALLIK, E.; SHAPIRA, R. Reversible inhibition of tomato fruit gene expression at high temperature. **Plant Physiology**, v.110, p.1207-1214, 1996.
51. LURIE, S.; KLEIN, J. D. Acquisition of low temperature tolerance in tomatoes by exposure to high temperature stress. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.116, p.1007-1012, 1991.
52. LURIE, S.; LEVIN, A.; GREVE, L. C.; LABAVITCH, J. Pectic polymer changes in nectarines during normal and abnormal ripening. **Phytochemistry**, v.36, n.1, p.11-17, 1994.
53. LURIE, S.; WATKINS, C.; ROSS G.; KLEIN, J. D.; FERGUSON, I. Prestorage heat treatment to extend storage of tomatoes. **Acta Horticultural**, v.343, p.128-130, 1992.
54. LYONS, J. M. Chilling injury in plants. **Annual Review of Plant Physiology**. v.24, p.445-466, 1973.
55. LYONS, J. M.; RAISON, J. K. Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. **Plant Physiology**, v.45, p.386-389, 1970.
56. MALIS-ARAD, S.; DIDI, S.; MIZRAHI, Y. Pectic substances: changes in soft and firm tomato cultivars and in non-ripening mutants. **Journal of Horticultural Science**, v.58, n.1, p.111-116, 1983.
57. MANESS, N. O.; RYAN, J. D.; MORT, A. J. Determination of the degree of methyl esterification of pectins in small samples by selective reduction of esterified galacturonic acid to galactose. **Analytical Biochemistry**, v.185, n.2, p.346-352, 1990.
58. MANGAS, J. J.; DAPENA, E.; RODRÍGUEZ, M. S.; MORENO, J.; GUTIÉRREZ, M. D.; BLANCO, D. Changes in pectic fractions during ripening of cider apples. **HortScience**, v.27, n.4, p.328-330, 1992.
59. MARANGONI, A. G.; JACKMAN, R. L.; STANLEY, D. W. Chilling-associated softening of tomato fruit is related to increased pectinmethylesterase activity. **Journal of Food Science**, v.60, n.6, p.1277-1281, 1995.

60. MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. A; LAFUENTE, M. T. Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase activities in flavedo of chilled 'Fortune' mandarin fruit. **Journal Plant Physiology**, v.150, p.674-678, 1997.
61. McCOLLUM, T. G.; D'AQUINO, S. & McDONALD, R. E. Heat treatment inhibits mango chilling injury. **HortScience**, v.28, n.3, p.197-198, 1993.
62. McCOLLUM, T. G.; DOOSTDAR, H.; MAYER, R. T. & McDONALD, R. E. Immersion of cucumber fruit in heated water alters chilling-induced physiological changes. **Postharvest Biology and Technology**, v.6, p.55-64, 1995.
63. McCOLLUM, T. G.; HUBER, D. J.; CANTLIFFE, D. J. Modification of polyuronides and hemicelluloses during muskmelon fruit softening. **Physiologia Plantarum**, v.76, p.303-308, 1989.
64. McDONALD, R. E.; NORDBY, H. E. & McCOLLUM, T.G. Epicuticular wax morphology and composition are related to grapefruit chilling injury. **HortScience**, v.28, n.4, p.311-312, 1993.
65. MERCER, M. D.; SMITTLE, D. A. Storage atmospheres influence chilling injury and chilling injury-induced changes in cell wall polysaccharides of cucumber. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.117, n.6, p.930-933, 1992.
66. MITCHAM, E. J.; GROSS, K. C.; NG, T. J. Tomato fruit cell wall synthesis during development and senescence. **Plant Physiology**, v.89, p.477-481, 1989.
67. MORIGUCHI, T.; SANADA, T.; YAMAKI, S. Seasonal fluctuations of some enzymes relating to sucrose and sorbitol metabolism in peach fruit. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.115, p.278-281, 1990.
68. MULAS, M.; LAFUENTE, M. T.; ZACARÍAS, L. Chilling effects on fatty acid composition of flavedo lipids in stored 'Fortune' mandarins. **Advances in Horticultural Science**, v.10, p.85-90, 1996.
69. MUÑOZ-DELGADO, J. A. El frío en la comercialización de los agrios. **Revista del Frío**, p.187-202, 1961.
70. MURATA, N.; ISHIZAKI-NISHIZAWA, O; HIGASHI, S.; HAYASHI, H.; TASAKA, Y.; NISHIDA, I. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. **Nature**, v.356, p.710-713, 1992.

71. NASCIMENTO, J. R. O. **Purificação, caracterização parcial e expressão da sacarose-fosfato sintase durante o amadurecimento da banana.** São Paulo: USP, 1997. 91p. (Dissertação de doutorado).
72. NASCIMENTO, J. R. O.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Partial purification and characterization of sucrose phosphate synthase from preclimacteric and climacteric bananas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.1103-1107, 1997.
73. NELMES, B. J.; PRESTON, R. D. Wall development in apple fruit: a study of the life history of a parenchyma cell. **Journal of Experimental Botany**, v.19, p.496-518, 1968.
74. NGUYEN, X. V.; MAZLIAK, P. Chilling injury induction is accompanied by galactolipid degradation in tomato pericarp. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.28, n.2, p.283-291, 1990.
75. NORBY, H. E.; YELENOSKY, G. Effects of cold hardening in acyl lipids of citrus tissues. **Phytochemistry**, v.23, p.41-45, 1984.
76. O'KANE, D.; GILL, V.; BOYD, P.; BURDON, R. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. **Planta**, v.198, p.371-377, 1996.
77. OLIEN, C. R.; CLARK, J. L. Changes in soluble carbohydrate composition of barley, wheat, and rye during winter. **Crop Science**, v.85, p.21-29, 1993.
78. PALMER, J. K. The banana. IN: Hulme, A. C. (Ed) **Biochemistry of fruits and their products.** (ed. A. C. Hulme). London: Academic Press, 1971, v.2, p.65-105.
79. PARKIN, K. L.; MARANGONI, A.; JACKMAN, R. L.; YADA, R. Y.; STANLEY, D. W. Chilling injury. A review of possible mechanisms. **Journal of Food Biochemistry**, v.13, p.127-153, 1989.
80. PERCY, A. E.; MELTON, L. D.; JAMESON, P. E. Xyloglucan and hemicelluloses in the cell wall during apple fruit development and ripening. **Plant Science**, v.125, p.31-39, 1997.
81. PURVIS, A. C.; KAWADA, K. & GRIERSON, W. Relationship between midseason resistance to chilling injury and reducing sugar level in grapefruit peel. **HortScience**, v.14, n.3, p.227-229, 1979.
82. RAISON, J. K.; LYONS, J. M. Chilling injury: a plea for uniform terminology. **Plant Cell Environment**, v.9, p.685-686, 1986.

83. RIKIN, A; BLUMENFELD, A; RICHMOND, E. Chilling resistance as affected by stressing environments and ABA. **Botanical Gazette**, v.137, p.307-312, 1976.
84. ROBERTSON, A J.; ISHIKAWA, M.; GUSTA, L. V.; MACKENZIE, S. L. Absciscic acid-induced heat tolerance in *Bromus inermis* leys cell-suspension cultures. **Plant Physiology**, v.105, p.181-190, 1994.
85. RODOV, V.; BEN-YEHOSHUA, S.; ALBAGLI, R. & FANG, D. Q. Reducing chilling injury and decay of stored citrus fruit by hot water dips. **Postharvest Biology and Technology**, v.5, p.119-127, 1995.
86. ROE, B.; BRUEMMER, J. H. Changes in pectic substances and enzymes during ripening and storage of 'Keitt' mangos. **Journal of Food Science**, v.46, p.186-189, 1981.
87. SABEHAT, A; WEISS, D.; LURIE, S. The correlation between heat-shock protein accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruit. **Plant Physiology**, v.110, p.531-537, 1996.
88. SALA, J. M. Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold-stored mandarin fruits. **Postharvest Biology and Technology**, v.13, p.255-261, 1998.
89. SÁNCHEZ-BALLESTA, M. T.; LAFUENTE, M. T.; ZACARÍAS, L.; GRANELL, A. Caracterización de um cDNA que codifica para la fenilalanina ammonio-lias y su expresión por bajas temperaturas en los cítricos. **IV Reunión de Biología Molecular de Plantas**. Sitges, Barcelona. España. Noviembre, p.128-129, 1997.
90. SAULNIER, L.; BRILLOUET, J. M. Structural studies of pectic substances from the pulp of grape berries. **Carbohydrate Research**, v.182, p.63-78, 1988.
91. SHALOM, N. B.; HANZON, J.; KLEIN, J. D.; LURIE, S. A postharvest heat treatment inhibits cell wall degradation in apples during storage. **Phytochemistry**, v.34, n.4, p.955-958, 1993.
92. SHEWFELT, A L.; PAYNTER, V. A; JEN, J. J. Textural changes and molecular characteristics of pectic constituents in ripening peaches. **Journal of Food Science**, v.36, p.573-575, 1971.
93. SIMANDJUNTAK, V.; BARRET, D. M.; WROLSTAD, R. E. Cultivar and maturity effects on muskmelon (*Cucumis melo*) colour, texture and cell wall polysaccharide composition. **Journal of the Science and Food Agricultural**, v.71, p.282-290, 1996.

94. STEELE, N. M.; McCANN, M. C.; ROBERTS, K. Pectin modification in cell walls of ripening tomatoes occurs in distinct domains. **Plant Physiology**, v.114, p.373-381, 1997.
95. THOM, E.; NEUHAUS, H.E. Oxidation of imported or endogenous carbohydrates by isolated chloroplasts from green pepper fruits. **Plant Physiology**, v.109, p.1421-1426, 1995.
96. TOGNETTI, J. A; SALERNO, G. L.; CRESPI, M. D.; PONTIS, H. G. Sucrose and fructan metabolism of different wheat cultivars at chilling temperatures. **Physiologia Plantarum**, v.78, p. 554-559, 1990.
97. TUCKER, G. A Introduction. In: Seymour, G. B.; Taylor, J. E.; Tucker, G. A **Biochemistry of fruit ripening**, 2^a ed, London: Chapman & Hall, 1996. cap.4: p.1-43.
98. TUCKER, G. A; GRIERSON, D. Fruit ripening. IN: **The biochemistry of plants - A comprehensive treatise**. (ed. D.D. Davies), London: Academic Press, 1987. v12, p.265-318.
99. ULRICH, R. Organic acids. IN: **The biochemistry of fruits and their products**. (ed. A C. Hulme), London: Academic Press, 1970, v.1, p.89-118.
100. VAN BUREN, J. P. The chemistry of texture in fruit and vegetables. **Journal of Texture Studies**, v.10, p.1-23, 1979.
101. VAZQUEZ-OCHOA, R. I.; COLINAS-LEON, M. T. Changes in guavas of three maturity stages in response to temperature and relative humidity. **HortScience**, v.25, n.1, p.86-87, 1990.
102. VIERLING, E. The roles of heat shock proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42, p.579-620, 1991.
103. VU, J. C. V.; NIEDZ, R. P.; YELENOSKY, G. Activities of sucrose metabolism enzymes in glycerol-grown suspension cultures of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Environmental and Experimental Botany**, v.35, n.4, p.455-463, 1995.
104. WANG, C. Y. Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress. **HortScience**, v.17, n.2, p.173-186, 1982.
105. WHITAKER, B. D. Changes in lipids of tomato fruit stored at chilling and non-chilling temperatures. **Phytochemistry**, v.30, n.3, p.757-761, 1991.

106. WHITING, G. C. Sugars. IN: **The biochemistry of fruits and their products.** (ed. A C. Hulme), London: Academic Press, 1970, v.1, p.1-31.
107. WISE, R. R.; NAYLOR, A W. Chilling-enhanced photooxidation. The peroxidative destruction of lipids during chilling to photosynthesis and ultrastructure. **Plant Physiology**, v.83, p.272-277, 1987.
108. WOLTER, F. P.; SCHMIDT, R.; HEINZ, E. Chilling sensitivity of *Arabidopsis thaliana* with genetically engineered membrane lipids. **Embo Journal**, v.11, p. 4685-4692, 1992.
109. WU, J.; BROWSE, J. Elevated levels of high-melting-point phosphatidylglycerols do not induce chilling sensitivity in an Arabidopsis mutant. **Plant Cell**, v.7, p.17-27, 1995.
110. YANG, S. F.; HOFFMAN, N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.35, p.155-189, 1984.
111. ZAUBERMAN, G.; FUCHS, Y.; ROT, I.; WEXLER, A Chilling injury, peroxidase, and cellulase activities in the peel of mango fruit at low temperature. **HortScience**, v.23, n.4, p.732-733, 1988.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DO SUCO E DO FLAVEDO DE TANGERINAS 'FORTUNE' DURANTE A MATURAÇÃO

CARACTERIZAÇÃO DO SUCO E DO FLAVEDO DE TANGERINAS 'FORTUNE' DURANTE A MATURAÇÃO

RESUMO

Foi realizada uma curva de maturação dos frutos tangerina 'Fortune' através de análises físicas e químicas do suco e flavedo do período de 1996/97 e análises químicas somente do flavedo dos anos de 93/94. Os frutos foram colhidos de um pomar em Sagunto, Valência - Espanha. Com as análises químicas do flavedo dos frutos, pretendeu-se estudar o comportamento da sacarose, glicose, frutose e amido, assim como as atividades das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS) e sacarose sintase (SS), relacionando os carboidratos com as fases de desenvolvimento das tangerinas. O peso e o tamanho dos frutos aumentaram de novembro até abril, enquanto a coloração mudou do verde para um alaranjado forte. Durante o processo de maturação, com o aumento dos sólidos solúveis e diminuição da acidez, os frutos atingiram um "ratio" igual a 10. Com o avanço da maturação houve um acúmulo de glicose, frutose e amido nos flavedos dos frutos; a sacarose se manteve constante e correspondeu aproximadamente a metade do teor de glicose e frutose. No final do mês de janeiro, os açúcares do flavedo das tangerinas alcançaram maior teor. Mudanças no teor de açúcar no flavedo durante a maturação não parece estar relacionada com a susceptibilidade dos frutos ao estresse pelo frio, a qual foi maior nos meses mais frios. A fase de amadurecimento interno coincidiu com o início da degradação do amido, diminuição dos açúcares redutores e baixa atividade da SPS. A atividade da enzima SS atingiu o mínimo em janeiro e a seguir aumentou apresentando atividade máxima em março. Em geral, a atividade da enzima SPS $V_{m\acute{a}x}$ diminuiu com a maturação desde novembro até abril, enquanto a SPS Lim não variou. Portanto, a atividade da SPS $V_{m\acute{a}x}$ foi maior que a da SS nos frutos menos maduros, e a da SS foi maior nos frutos mais maduros.

CHARACTERIZATION OF THE JUICE AND FLAVEDO OF 'FORTUNE' MANDARINS DURING MATURATION

SUMMARY

A maturation curve for 'Fortune' mandarins was determined using physical and chemical analyses of the juice and flavedo of fruits harvested in the 1996/97 period and a chemical analysis only of the flavedo from fruits harvested in 1993/94. Fruits were harvested from an orchard in Sargunto, Valence, Spain. The weight and size of the fruit barely increased from November till April, whereas fruit colour changed from green to dark orange. Soluble solids increased and the acidity decreased along the season, reaching the fruits a maturity index of 10 in April. Glucose, fructose, and starch accumulated in the fruit flavedo from November, reaching the higher contents at the end of January. The sucrose content, however, kept steady and, in general, was about half of that of glucose and fructose. Changes with maturity in the flavedo sugar content appear not to be related to the changes in the susceptibility of the fruit to cold stress, which was higher in the colder months. The internal ripeness phase was concomitant with the beginning of starch degradation, the decrease in reducing sugar and the lowest SPS activity. The SS enzyme activity reached a minimum in January and afterwards it increased reaching the maximum activity in March. In general, the SPS $V_{\text{máx}}$ enzyme activity decreased with the maturation from November to April, whereas the SPS lim did not vary. The SPS $V_{\text{máx}}$ activity was higher than the SS in the immature fruits and the SS was higher in the more ripe fruits.

2.1. INTRODUÇÃO

O fruto tangerina 'Fortune' é um híbrido da tangerina 'Dancy' (*C. tangerina* Hort. ex Tanaka) x Clementina 'Fino' (*C. clementina* Hort. ex Tanaka). É considerada uma variedade tardia e, portanto, o seu cultivo é muito valorizado a fim de estender o comércio de tangerinas. Porém, são frutos com grande susceptibilidade à injúria pelo frio.

O conhecimento da variação dos sólidos solúveis totais e da acidez do suco de frutos cítricos durante a maturação é muito importante, a fim de que se possa identificar o índice de maturidade ótimo para a colheita. Do mesmo modo, o estudo do flavedo, a parte externa colorida dos frutos, tem grande importância devido à aparência externa e produtividade, pela relação que há entre os constituintes do flavedo e a manutenção da qualidade dos frutos no pomar ou durante o armazenamento a frio, e pela relação entre o conteúdo de açúcares da folha (SCHAFFER *et al.*, 1985) e do flavedo com a produtividade dos frutos. De acordo com PURVIS *et al.* (1979) os açúcares redutores do flavedo e albedo de pomelos, possivelmente desempenham um papel na promoção da resistência à injúria pelo frio.

Os carboidratos são os principais constituintes do flavedo e originam-se dos assimilados fotossintetizados. Os frutos verdes são capazes de realizar fotossíntese, mas isto é limitado e a maior parte dos assimilados provém de outras partes da planta (PHAN, 1970). Entretanto, os frutos diferem em como estes assimilados acumulam-se durante o desenvolvimento e amadurecimento. Alguns frutos acumulam o total de seus carboidratos antes do início do amadurecimento. Estes são armazenados primariamente como amido, como por exemplo em bananas, ou como açúcares solúveis em tomates (TUCKER, 1996).

De acordo com XU *et al.* (1989) a sacarose é o principal carboidrato importado por muitos tecidos das plantas. Desde que a sacarose não é um substrato imediato para a maioria dos processos envolvidos no crescimento, desenvolvimento e armazenamento na maior parte dos tecidos, freqüentemente a conversão da sacarose em hexoses é o ponto inicial do metabolismo dos tecidos que a utilizam. WALKER *et al.* (1978) reportaram que a taxa de sacarose importada é regulada pelo gradiente de concentração da sacarose entre as folhas e os frutos de tomates e há uma relação inversa entre taxas importadas e os níveis de sacarose nos frutos. As enzimas que metabolizam a sacarose também podem regular a sacarose importada para os frutos.

Entre elas tem-se SPS que atua na síntese ou resíntese da sacarose a partir da glicose e frutose oriundas ou não da hidrólise desta pela SS. As hexoses presentes podem ser utilizadas tanto na ressíntese da sacarose quanto para a síntese do amido.

Sabe-se que durante o desenvolvimento dos frutos cítricos, em geral, aumenta o teor dos açúcares no suco, especialmente o da sacarose. Porém, não se tem muito conhecimento do comportamento da sacarose, açúcares redutores e amido presentes no flavedo, assim como das atividades da SPS e SS envolvidas no metabolismo desses carboidratos. É neste contexto que se objetiva, neste trabalho, estudar os referidos carboidratos do flavedo e enzimas relacionadas com o seu metabolismo (SPS e SS), assim como identificar as fases do desenvolvimento das tangerinas 'Fortune' relacionando-as com o comportamento dos açúcares, e avaliar a possível relação entre as modificações nos açúcares durante a maturação desta cultivar e a sua susceptibilidade ao frio.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Material vegetal

Foram coletadas ao acaso de 12 árvores adultas, tangerinas 'Fortune', situadas em um pomar em Sagunto, Valência - Espanha. Foram colhidos periodicamente (cada 15 a 20 dias) 45 frutos, sendo 3 repetições de 15 frutos, desde novembro de 1993 a abril de 94 (seis colheitas) e desde novembro de 1996 até abril de 97 (nove colheitas). Análises do suco e do flavedo foram realizadas a fim de se determinar uma curva de maturação através das mudanças físicas e químicas do ano de 96/97, e análises químicas do flavedo para o ano de 93/94. Os flavedos obtidos dos frutos foram picados, homogeneizados, acondicionados em embalagens plásticas (PVC), congelados em nitrogênio líquido e armazenados em câmara fria a -80°C. As análises do suco dos frutos foram realizadas logo após a sua extração.

No pomar de Sagunto, as temperaturas mínimas e máximas e umidades relativas médias dos meses de dezembro, janeiro e fevereiro de 1993/94 foram, respectivamente: 4,07, 18,26°C; 3,69, 17,00°C e 5,17, 18,90°C; 61,90%, 54,04% e 52,91%. E em 1996/97 foram, respectivamente: 6,70, 16,86°C; 6,47, 14,95°C e 5,15, 18,87°C; 67,48%, 69,61% e 64,75%.

2.2.2. Análise estatística

A apresentação descritiva dos parâmetros referentes a caracterização dos frutos foi feita através de gráficos de linhas com apresentação de médias e erros padrões.

2.2.3. Análises realizadas para a curva de maturação

2.2.3.1. Peso

Foi obtido através de uma balança semi-analítica Mettler modelo PC 2000 e os valores expressos em gramas.

2.2.3.2. Diâmetro transversal e longitudinal

Obtidos com paquímetro, sendo as medidas expressas em centímetros.

2.2.3.3. Cor

Realizada através do colorímetro Hunterlab Meter D25-PC2. Foram efetuadas 4 leituras em regiões distintas da zona equatorial . O índice de cor utilizado foi a relação “a/b”. Os valores “a/b” negativos correspondem aos frutos verdes, os próximos ao zero a frutos amarelos ou “virando” de coloração; já os valores “a/b” positivos, à medida que aumentam, representam a variação da cor do amarelo ao laranja.

2.2.3.4. Sólidos solúveis totais (SST)

Foi utilizado um refratômetro digital ATAGO/ RX-1000, onde os resultados são expressos em graus Brix.

2.2.3.5. pH

Obtido através do aparelho da marca Crison (micro pH-2001).

2.2.3.6. Acidez total titulável (ATT)

Determinada a partir da diluição de 5 ml do suco com 10 ml de água destilada e titulado com NaOH 0,1N até a neutralização do suco, sendo esta visualizada com o auxílio do indicador fenolftaleína. Os resultados são expressos em mEq de ácido cítrico/100 ml de suco.

2.2.3.7. Determinação de açúcares do flavedo (extração, purificação e condições do equipamento)

Os açúcares do flavedo foram extraídos de acordo com PURVIS *et al.* (1979). Foi pesado 1 grama do flavedo e adicionados 10 ml de etanol 80% em ebulição. A amostra foi triturada durante 1 minuto em Polytron por 3 vezes, deixada em repouso e o sobrenadante separado. Foram adicionados mais 10 ml de etanol a 80% em ebulição com posterior agitação por 2 minutos. Este segundo sobrenadante foi juntado ao

primeiro e repetida a adição de 10 ml de etanol 80% para a obtenção do terceiro sobrenadante. Os sobrenadantes foram filtrados através de lã de vidro e, adicionado ao filtrado, 2 ml de rafinose 21% (padrão interno). O filtrado foi centrifugado em centrífuga refrigerada a 10.000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante concentrado em rotavapor até cerca de 1 ml e então diluído o extrato a 5 ml.

Para a purificação da amostra utilizou-se filtro Sepak "Elud Bond" C-18 (Varian), após a ativação deste com 2 ml de acetonitrilo e a lavagem com 6 ml de água bidestilada. Foi filtrado 1 ml da amostra em "Elud Bond" e passado mais 3 ml de água bidestilada, a qual foi recolhida junto com a amostra. Posteriormente, foi filtrado em filtro Millipore - 0,45 µm. Foram injetados 20 µl da amostra em cromatógrafo HPLC, acoplado a um microcomputador que continha o programa Millenium, a um sistema de controle (Waters 600 E-16), um refratômetro como detector (Waters 410) e um injetador automático (Waters 717 plus). As condições utilizadas foram: coluna (Phenomenex) para açúcares de 300 x 7,8 mm, uma pré-coluna (Phenomenex) com 50 X 7,8 mm, água como solvente, fluxo = 0,6 ml/ minuto e temperatura de 85°C.

Nas condições cromatográficas estabelecidas, os tempos de retenção dos açúcares foram: rafinose – 10,35 minutos, sacarose – 11,68 min., glicose – 13,59 min. e frutose – 16,97 min.

Os resultados foram expressos em mg do açúcar analisado por grama do flavedo utilizado para a análise.

2.2.3.8. Determinação de amido

De acordo com LAFTA & LORENZEN (1995) para a análise de amido foi utilizado o resíduo da extração dos açúcares redutores e não redutor, citada anteriormente. O resíduo foi secado com ar forte, a fim de se evaporar o etanol, e a seguir foi congelado e liofilizado. Foram pesados triplicatas de 20 mg do resíduo seco em tubos Ependorf e efetuada uma reidratação com 1,0 ml de água destilada. O resíduo reidratado foi aquecido a 90°C/1hora para gelatinizar o amido. A seguir foi adicionado 1 ml da solução de amiloglucosidase (10 Unidades/ml, 20 mM NaF, 100 mM de tampão acetato - pH 4,5), e deixado por 48 horas a 40°C. Após este tempo os tubos de Ependorf foram centrifugados e retirado 0,5 ml do sobrenadante de cada tubo, para a análise de glicose pela reação enzimática glicose-oxidase. Os resultados foram expressos em µg de amido por g de flavedo utilizado para a análise.

2.2.3.9. Extração e determinação da reação de atividade das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS) e sacarose sintase (SS):

O extrato contendo as duas enzimas foi preparado a partir da trituração de 1 g de flavedo em mortero, com adição de nitrogênio líquido. Após a obtenção de um pó fino, este foi colocado em tubo de centrifuga (foi anotado o peso do pó obtido para posterior cálculo), e acrescentados 5 ml do tampão de extração, seguido de agitação. O tampão de extração continha 50 mM Mops (ácido propanosulfônico 3-[N-morfolino]) -NaOH (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5 mM DTT (-1,4-dithio-DL-threitol ou -threo -1,4-dimercapto-2,3-butanodiol), 0,1% (v/v) Triton X-100. A seguir o extrato bruto foi centrifugado a 15.000 rpm/30 min., e o sobrenadante foi desalinizado por filtração em colunas Sephadex G-25 (1 x 5 cm), equilibrada com o tampão da extração sem o Triton X-100 (GUY *et al.*, 1992).

Para a determinação da reação de atividade da sacarose fosfato sintase foram utilizados um substrato limitante (SPS lim) e um substrato de saturação (Vmax). No ensaio limitante foi efetuada uma mistura de 25 µl do tampão substrato contendo 10 mM UDP-glicose, 10 mM Pi (um inibidor), 3 mM frutose 6-fosfato, 12 mM glicose 6-fosfato (um ativador), 50 mM Mops-NaOH (pH 7,5), 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT, mais 45 µl do extrato desalinizado. Para o ensaio da Vmax utilizou-se o mesmo tampão substrato com exceção do inibidor Pi e das concentrações da frutose 6-fosfato e da glicose 6-fosfato que foram de 10 e 40 mM, respectivamente. As reações ocorreram por 10 minutos a 25°C e foram finalizadas com a adição de 70 µl de KOH 30% (p/v), seguida de uma incubação por 10 minutos na água em ebulição. A seguir o material foi resfriado e os açúcares foram determinados através do método de Fenol-Sulfúrico (DUBOIS *et al.* 1956), onde foram preparados padrões de 20 a 100 µg/ml. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda a 490 nm.

A determinação da reação de atividade da sacarose sintase foi realizada através da quantificação de sacarose formada a partir da UDP-glicose e frutose, utilizando-se o método do Fenol-Sulfúrico citado acima. A mistura do tampão substrato mais extrato foi a mesma utilizada para o ensaio da SPS Vmax, com exceção de que 10 mM de frutose substituíram a frutose 6-fosfato e a glicose 6-fosfato. Os resultados obtidos foram expressos em µg de sacarose formada por grama de proteína x minuto.

2.2.3.10. Determinação de proteínas totais

Foi efetuada pelo método de BRADFORD (1976), a fim de se calcular a atividade específica das enzimas SPS e SS. Foram homogeneizados 100 µl do extrato enzimático com 5 ml do reagente de cor. Uma curva padrão foi realizada com padrões de concentrações de 10 a 60 µg de BSA/ml. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 495 nm. Os resultados obtidos foram expressos em mg de proteína por grama de flavedo utilizado para a extração.

2.2.3.11. Escala subjetiva de danos por frio no flavedo

Foram colhidas 3 repetições de 10 tangerinas cada uma, em três épocas diferentes (09/12/96, 27/01/97 e 03/03/97) e armazenadas a 2°C. Os frutos foram avaliados quanto aos danos por frio no flavedo, após 7, 14, 21 e 28 dias para a primeira colheita e 7, 14, 21, 28 e 35 dias para as segunda e terceira colheitas.

Os danos pelo frio nos frutos de tangerina foram avaliados, subjetivamente, utilizando-se uma escala visual baseada no grau de necroses e na intensidade de manchas. Os frutos foram classificados da seguinte forma: 0 = frutos sem danos; 1 = danos leves; 2 = moderados e 3 = severos. Calculou-se o Índice de danos por frio, através da soma dos resultados das multiplicações entre o número dos frutos pelo valor correspondente de sua classificação, dividida pelo número total de frutos avaliados.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Características físicas e químicas do fruto

2.3.1.1. Peso e diâmetros (transversal e longitudinal)

Os frutos 'Fortune' da colheita de 96/97 apresentaram pesos de 80,09 a 124,52 g, e os diâmetros longitudinal e transversal variaram de 4,69 a 5,23 cm e de 5,46 a 6,72 cm, respectivamente. Do início da coleta dos frutos (13/11/96) até o final (03/04/97), os frutos apresentaram um aumento médio nos dados de tamanho e peso. Porém, nas primeiras coletas, encontrou-se grande variação entre os frutos das três repetições, e ao longo do tempo esta variação foi diminuindo, isto é, acompanhando um ligeiro aumento no tamanho e peso dos frutos, houve também a uniformização destes.

O crescimento e desenvolvimento de frutos cítricos ocorre em três estádios (GOREN & MONSELISE, 1964). De quatro a nove semanas após a formação do

fruto, o tamanho e o peso aumentam devido ao crescimento do albedo e flavedo pela divisão celular. Então, no período de alargamento, o fruto aumenta em tamanho pelo alargamento celular somente através da diferenciação e expansão do tecido do albedo. Finalmente, no período de maturação, os ácidos das vesículas de suco diminuem, enquanto o flavedo passa do verde ao amarelo ou laranja e aumenta ligeiramente em espessura (TING & ATTAWAY, 1971).

As duas primeiras etapas citadas anteriormente caracterizam a fase de pré-maturação. Ainda na fase de maturação o fruto atinge o crescimento pleno, além da máxima qualidade comestível. O amadurecimento corresponde ao período final da maturação (excluído da fase de desenvolvimento), durante o qual o fruto apresenta-se completamente desenvolvido, e onde as principais mudanças que ocorrem são químicas (RYALL & LIPTON, 1979).

Portanto, pode-se dizer que as alterações de peso e diâmetros ocorridas quando os frutos estavam verdes e “virando de cor”, observadas na Figura 1, caracterizam a fase de maturação das tangerinas ‘Fortune’, a qual continua até a última coleta de tangerinas. A fase de amadurecimento, que está incluída na maturação dos frutos, parece iniciar-se a partir do final do mês de janeiro, de acordo com os resultados de açúcares discutidos posteriormente. O amadurecimento se caracteriza pelo desenvolvimento da qualidade comestível através das modificações químicas, porém como se trata de um fruto não climatérico, esta fase não é muito bem definida.

2.3.1.2. Cor

A mudança na coloração foi bem acentuada. Na primeira coleta (13/11/1996), o valor médio para a relação a/b foi de -0,66, caracterizando a cor verde para os frutos. Na segunda coleta (28/11/96), os frutos se apresentaram “virando de cor” (do verde para o amarelo), uma vez que o valor médio foi próximo a zero (0,26), caracterizando a transformação de cloroplastos em cromoplastos (ELIATI *et al.*, 1975). Da segunda à sétima coleta (final de novembro a meados de fevereiro) houve um aumento gradativo da cor com valores de 0,25 a 1,23 até atingir uma estabilização e uniformização, como se pode observar na Figura 1 da sétima a nona coleta. A coloração alaranjada atingida pelas tangerinas nestes últimos pontos é um importante e atrativo atributo de qualidade aos consumidores. Esta coloração final dos frutos é dependente da intensidade da luz (GOLDSCHMIDT, 1988), baixas temperaturas e altos níveis de açúcares (HUFF, 1984).

TADEO *et al.* (1987) reportaram que as tangerinas Clemeninas cultivares Fina e Oroval, apresentaram índice positivo para cor próximo de 1,0 em novembro, e a ‘Hernandina’, mais tardia, somente no final de dezembro. A ‘Fortune’ estudada neste trabalho, se situa entre a ‘Hernandina’ e as outras duas. Porém, somente a cor, tamanho e peso não são características físicas suficientes como indicadores de maturidade. São necessárias também as avaliações químicas internas. A cultivar Fortune atinge a coloração apropriada muito antes da maturidade interna ou comercial.

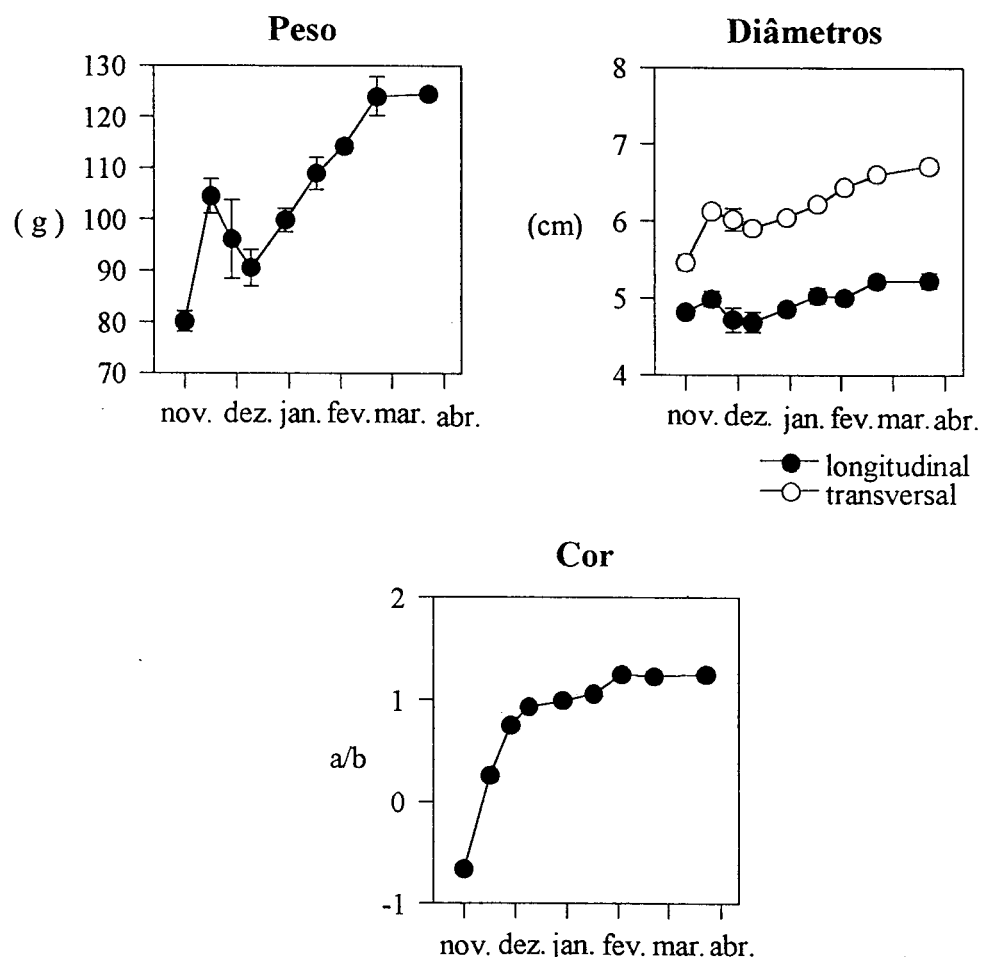


Figura 1: Mudanças no peso, tamanho e cor dos frutos de tangerinas ‘Fortune’ durante a maturação em 1996/97.

2.3.1.3. Acidez, pH, °Brix e Índice de maturidade (“ratio”)

Naturalmente, ao longo do tempo, houve aumento dos valores de pH e °Brix (sólidos solúveis totais), e diminuição da acidez (Figura 2). Porém, pode-se notar que as tangerinas ‘Fortune’, apesar da diminuição da acidez com a maturação, ainda

apresentaram uma acidez considerável na época de sua colheita comercial, porém com alto valor de doçura (13,3 °Brix).

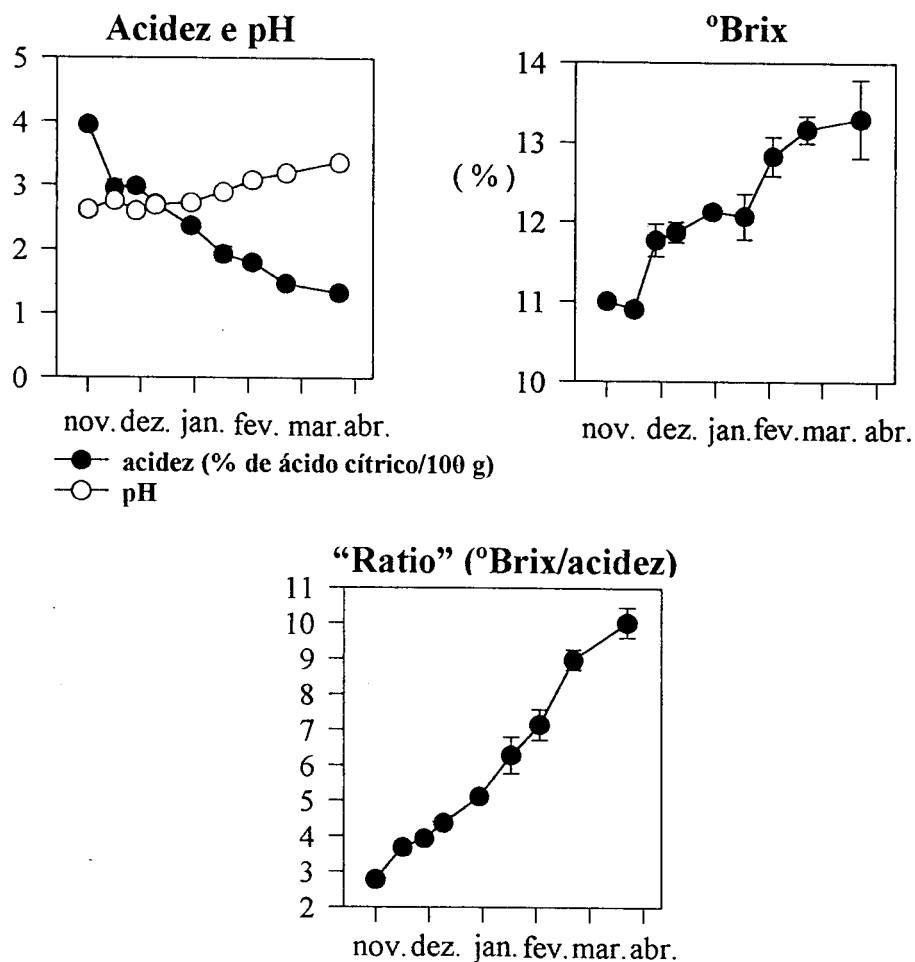


Figura 2: Mudanças de acidez total titulável (ATT - % ácido cítrico/100 g), pH, °Brix e Índice de maturidade (“ratio”) dos frutos de tangerinas ‘Fortune’ durante a maturação em 1996/97.

A diminuição na concentração de acidez titulável na maior parte dos frutos cítricos durante a maturação pode ser parcialmente devido a utilização de ácidos como substrato respiratório (ULRICH, 1970), e devido a diluição com o aumento no tamanho do fruto e conteúdo de água (KIMBALL, 1984). Apesar desta diluição o aumento em sólidos solúveis se faz presente, pois segundo COOMBE (1976), na maior parte dos frutos as concentrações de solutos estão aumentando enquanto as células

estão se expandindo. Isto significa que ambos, água e solutos estão se acumulando ao mesmo tempo, mas a taxa de acúmulo de solutos é maior.

O ácido encontrado em maior quantidade nos frutos cítricos é o ácido cítrico. A fixação de CO₂ no escuro pode estar envolvida na síntese de ácido cítrico nas vesículas de suco (YEN & KOCH, 1990). Além disso, o acúmulo de ácido cítrico pode ser devido a um bloqueio na atividade de aconitase, a qual interfere na conversão de citrato a ácido aconítico. ECHEVERRIA & VALICH (1989), confirmaram a ausência das atividades de aconitase e citratoliase em vesículas maduras de suco. A concentração de ácido cítrico normalmente encontrada nos sucos de laranjas e tangerinas é de 0,5-1,5 g/100 ml (YOMAKI, 1989). A acidez dos frutos 'Fortune' se situa próxima a esse maior limite, quando também atinge um "ratio" de 8-10, o qual permite o início da colheita comercial.

O índice de maturidade comercial baseia-se em parâmetros internos, tais como: diminuição da acidez e o aumento do pH, sólidos solúveis (principalmente açúcares) e "ratio". Com a maturação, na maioria dos frutos cítricos há um aumento de glicose, frutose e sacarose e em tangerinas, TING & ATTAWAY (1971) e TADEO *et al.* (1987) observaram que a sacarose foi o açúcar que mais aumentou.

2.3.1.4. Modificações no conteúdo de carboidratos do flavedo (sacarose, glicose, frutose e amido)

De acordo com a Figura 3, observa-se que os carboidratos estudados no flavedo das tangerinas 'Fortune' aumentam durante a maturação do fruto, principalmente a glicose e frutose até o final de janeiro, depois apresentaram uma queda e então mantiveram-se constantes. A concentração de sacarose de frutos colhidos em 1993/94, no mês de novembro, foi cerca de duas vezes maior do que a glicose e frutose quando os frutos se encontravam verdes; depois aumentou até final de janeiro e após uma queda manteve-se praticamente constante. Em 96/97, parece ter ocorrido o mesmo comportamento para os açúcares, porém de maneira menos acentuada. Em ambos os anos de colheita, a glicose e frutose estão bem maiores do que a sacarose, coincidindo com a mudança na coloração do flavedo. PURVIS *et al.* (1979), reportaram que o aumento em níveis de açúcares redutores auxilia na resistência do exocarpo de pomelos à injúria pelo frio, talvez pela estabilização das membranas celulares.

Nas tangerinas 'Fortune' colhidas em 1996/97, o pico de aumento dos açúcares redutores e da sacarose no final do mês de janeiro coincidiu com o menor índice de danos por frio ($IDF=0,67$) em frutos desta época, os quais foram armazenados por 28 dias a 2°C. Assim como tangerinas colhidas em início de dezembro (09/12/1996), com o menor conteúdo de açúcares, apresentaram o maior índice de danos por frio ($IDF=1,4$), e frutos do início de março (03/03/97) apresentaram danos ($IDF=0,8$) e açúcares com valores muito próximos aos do final do mês de janeiro. Entretanto, a comparação dos resultados obtidos em um estudo prévio, onde se determinou as mudanças na susceptibilidade ao frio, periodicamente desde novembro até maio, nos frutos colhidos em 1993/94 (LAFUENTE *et al.*, 1997) e as mudanças encontradas nas análises de açúcares, expõe claramente que os frutos mais tolerantes ao frio apresentaram em geral, menor teor de açúcares. Portanto, pode-se concluir através dos resultados do presente trabalho, que as modificações nos carboidratos do flavedo estão mais relacionadas com o processo de maturação do fruto do que com as modificações da susceptibilidade ao frio, que parecem ser claramente influenciadas pelas temperaturas do campo (VERCHER *et al.*, 1994).

Acompanhando a troca da cor, ocorre um acúmulo de açúcares tanto no suco como no flavedo do fruto. Porém, a evolução dos açúcares é distinta em ambas as partes do fruto. No suco se acumula principalmente sacarose, sendo que os aumentos em frutose e glicose são bem menores (ORTIZ *et al.*, 1982), ao contrário do que ocorre no flavedo.

Na maior parte das plantas superiores, os principais produtos finais da fotossíntese das folhas são o amido e a sacarose. Entretanto, as espécies dividem os fotossintetizados diferentemente entre amido e sacarose, e vários fatores afetam este modelo de partição (HUBER, 1989). O amido é o principal carboidrato de armazenamento em *Citrus* (SANZ & GUARDIOLA, 1988). Em muitos frutos a degradação do amido para formar glicose, frutose ou sacarose, é uma característica do evento de amadurecimento.

O amido das tangerinas 'Fortune' aumentou com a maturação similarmente a glicose e a frutose. Nos anos de 93/94 houve um grande aumento (cerca de 6000 $\mu\text{g/g}$) até o final de fevereiro (Tabela 1), enquanto que em 96/97, a início de março ainda se teve valores em torno de 2000 $\mu\text{g/g}$ (Figura 3). Por outro lado, os níveis de amido em

dezembro de 96 foram um pouco maiores que os de 93. Essa variação na concentração de amido entre diferentes anos de colheita pode ser justificada pela variação climática e deficiência de minerais. YELENOSKI & GUY (1977) verificaram que temperaturas de 10°C causaram um aumento do teor de açúcares das folhas e pedúnculos de laranjas ‘Valencia’. LAVON *et al.* (1995), reportaram que folhas de *Citrus* deficientes em magnésio e cálcio acumularam grandes quantidades de amido, enquanto a deficiência de potássio levou ao conteúdo mais baixo de amido, aumento significativamente mais alto de açúcares solúveis, e atividade da invertase ácida sete vezes maior do que em folhas controle.

DATAS (1993/94)	AMIDO
dezembro (02/12/93)	125,58
janeiro (13/01/94)	2205,55
fevereiro (28/02/94)	5964,16

Tabela 1: Concentração de amido no flavedo de frutos de tangerina ‘Fortune’ (µg/g de material fresco), durante a maturação nos anos de 1993/94.

O teor de sacarose permaneceu praticamente constante durante a maturação dos frutos, enquanto que as concentrações de amido, glicose e frutose aumentaram similarmente, sendo que estes dois últimos açúcares são metabólicos intermediários da degradação reversível tanto da sacarose quanto do amido. As enzimas metabolizantes da sacarose em tecidos de depósito podem ter um papel no armazenamento e utilização de açúcares em células de depósito, ou podem estar associadas com o transporte no floema (LOWELL *et al.*, 1989). Portanto, podem ter ocorrido atividades simultâneas das enzimas de síntese e degradação da sacarose levando ao aumento de açúcares redutores e de amido, porém sem que houvesse diminuição da sacarose. Também podem ter ocorrido atividades das enzimas de degradação do amido juntamente com as de síntese, auxiliando no aumento de glicose e de frutose. Em estudo com *Curcubita maxima* D. ‘Delica’, IRVING *et al.* (1997) também verificaram o aumento do teor de amido durante a fase de crescimento dos frutos, e durante a fase de amadurecimento o amido foi degradado.

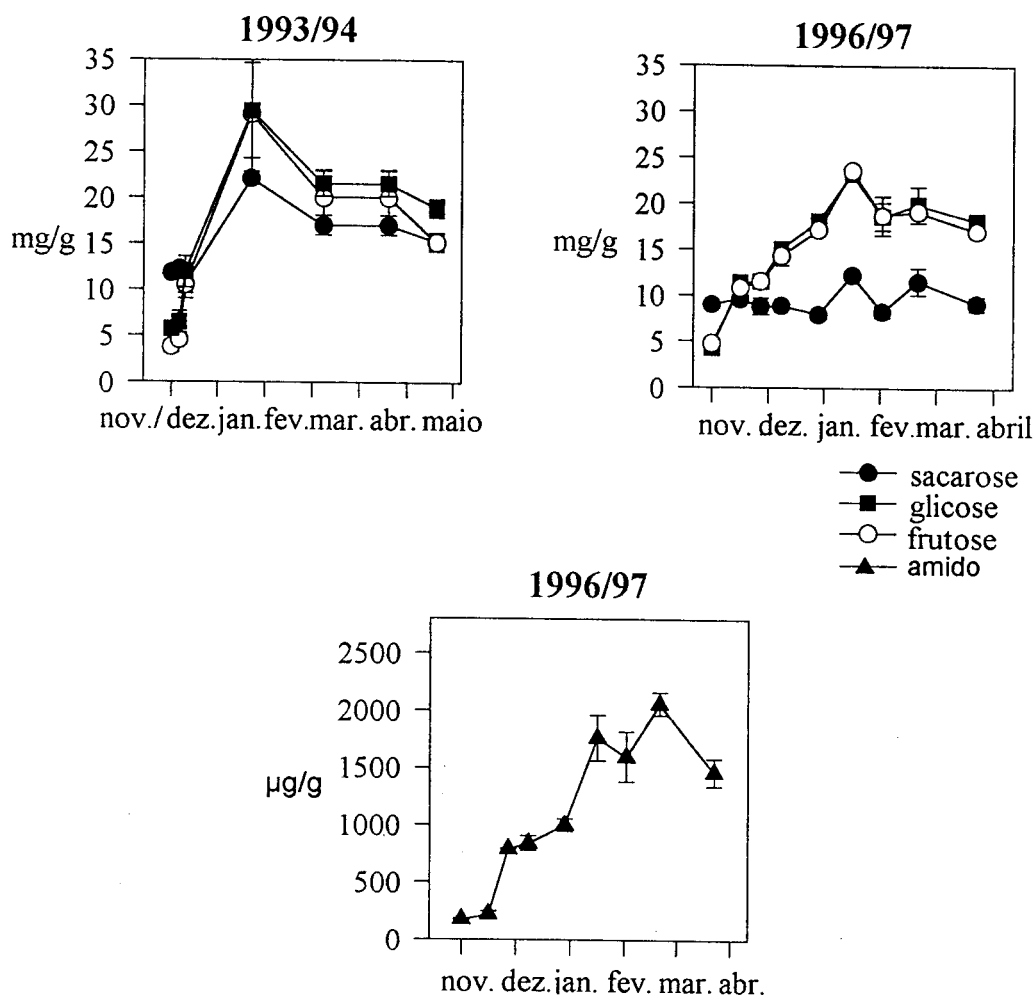


Figura 3: Sacarose, glicose, frutose (mg/g) e amido (µg/g) do flavedo de tangerinas 'Fortune' durante a maturação.

Os níveis de açúcares redutores alcançaram o máximo no final do mês de janeiro, enquanto o maior nível de amido foi encontrado em março, o que coincidiu com a maturação comercial dos frutos (ratio= 8). De acordo com McCREADY (1977), o amido está presente no desenvolvimento de frutos cítricos em todos os componentes, mas é mais abundante no albedo. Entretanto, é um carboidrato de armazenamento transitório, provendo energia para o crescimento e respiração de frutos imaturos e geralmente desaparece no amadurecimento.

2.3.1.5. Atividades das enzimas sacarose fosfato sintase (SPSV_{max} e SPS_{lim}), sacarose sintase (SS), e teor de proteínas

A sacarose é a principal forma de açúcar translocado na maioria das plantas. Sua síntese é catalisada pela SPS e sacarose-6-fosfato e sua degradação é catalisada pela sacarose sintase (SS) ou invertase (PREISS, 1982). Apesar da SS catalisar uma interconversão reversível de sacarose e UDP para UDP glicose e frutose, ela tem sido mais positivamente relacionada com a taxa de crescimento dos frutos e com o aumento no conteúdo de amido em tomates (WANG *et al.*, 1993), batatas (GEINGENBERGER & STITT, 1993) e bananas (CORDENUNSI & LAJOLO, 1995).

Pela Figura 4 pode-se observar que no final do mês de novembro e início de dezembro, a maior atividade da SPS em relação a SS pode ser a causa da breve estabilização no teor de glicose e frutose. Porém, não houve aumento da sacarose e sim do amido, indicando a possível presença de uma outra enzima, além da SS, que pode atuar na degradação da sacarose. De uma maneira geral, a atividade da SPS mostrou uma diminuição com a maturação, de 250,44 a 124,69 µg/g prot. min., enquanto que a SS, mesmo com uma variação em “forma de serra”, apresentou valor inicial e final de 212,98 e 198,62 µg/g prot. min., respectivamente. Como houve uma elevação no teor de açúcares redutores e de amido, apesar deste último estar presente em pequenas quantidades no flavedo das tangerinas, pode-se dizer que a atividade da enzima que geralmente atua degradando a sacarose (SS) foi maior do que a atividade da enzima de síntese (SPS). Ou seja, também para as tangerinas ‘Fortune’ houve um aumento da atividade da SS na fase de maturação, quando os frutos ainda estavam aumentando de peso e tamanho. A SS permite a hidrólise da sacarose, fornecendo a UDP-glicose necessária para a formação da parede celular e síntese do amido (PREISS, 1982).

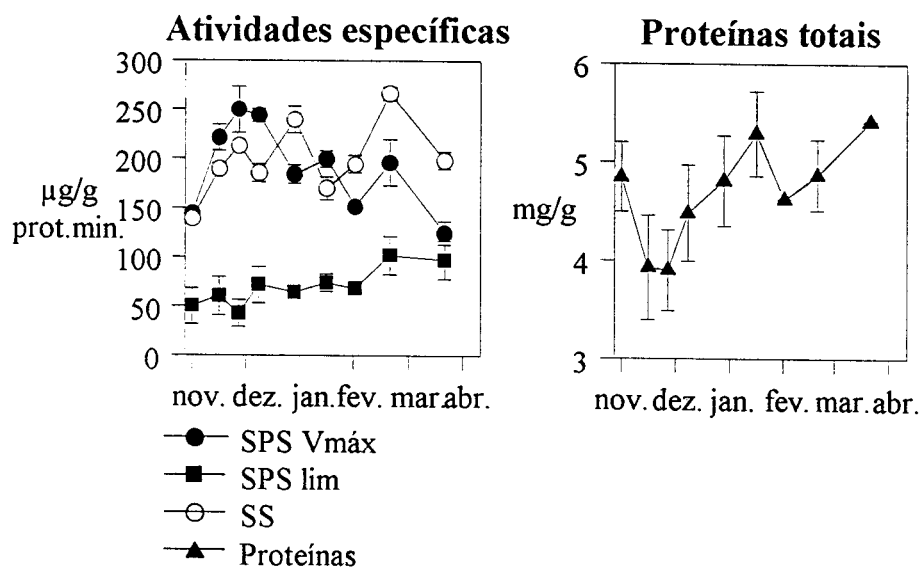


Figura 4: Atividades específicas ($\mu\text{g/g prot.min.}$) das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS Vmáx e SPS lim), sacarose sintase (SS) e proteínas totais (mg/g) do flavedo de tangerinas 'Fortune' em colheitas de 1996/97.

HUBBARD *et al.* (1989) demonstraram que a concentração de sacarose não aumenta a menos que a atividade da SPS exceda a soma das atividades das enzimas que degradam a sacarose. Verifica-se que a atividade da SPS na resíntese da sacarose, assim como o armazenamento da sacarose intacta, translocada sem hidrólise das folhas fotossintetizantes, foram suficientes, pelo menos, para manter o nível da sacarose relativamente constante. De acordo com MIRON & SCHAFFER (1991), nos estádios iniciais do desenvolvimento, quando a atividade da SPS é baixa, o armazenamento da sacarose pode ocorrer através da sacarose intacta translocada sem hidrólise, sem que haja a presença de outro mecanismo. Em vesículas de sucos, segmentos da polpa ou folhas de *Citrus unshiu* Marc. foi verificado por KOMATSU *et al.* (1996) alto nível de expressão de genes da SPS em frutos maduros, onde ocorre o acúmulo da sacarose, e a baixa expressão em frutos imaturos.

A degradação da sacarose comumente ocorre no citosol, mas a síntese do amido se efetua em outro compartimento, o amiloplasto. Portanto, para suprir a biossíntese do amido, um ou mais produtos derivados da hidrólise da sacarose devem atravessar a membrana do amiloplasto. VIOLA *et al.* (1991) reportaram que compostos de seis carbonos e não de três carbonos são transportados para os

plastídeos durante a síntese ativa do amido em locais de armazenamento nas células de “tecidos não-verdes”.

No final do mês de janeiro, a queda da SS foi simultânea ao aumento dos açúcares redutores, caracterizando a inibição da atividade desta enzima pela glicose e frutose livres, como reportado por CLAUSSEN *et al.* (1986). No mês de fevereiro, já na fase de amadurecimento, houve aumento tanto da SS quanto da SPS, porém o da SS foi maior, caracterizando o último pico analisado do amido. A seguir ambas as enzimas apresentaram diminuição na atividade. A forte queda da atividade enzimática tanto da SPS quanto da SS, assim como do amido, sacarose, glicose e frutose, mais uma vez parece indicar a fase de amadurecimento das tangerinas ‘Fortune’. Supõe-se que em uma próxima análise se poderia identificar o aumento dos açúcares solúveis.

2.4. CONCLUSÕES

Os frutos apresentaram aumento nos valores de tamanho e peso durante a maturação, enquanto a coloração foi do verde até o alaranjado forte. Com o aumento dos sólidos solúveis e a diminuição da acidez, os frutos atingiram um índice de maturidade (“ratio”) igual a 10. Entre 8 a 10 se tem a maturidade comercial das tangerinas.

Com a maturação dos frutos houve maior acúmulo de glicose e frutose no flavedo das tangerinas ‘Fortune’, e o aumento inicial destes açúcares coincidiu com a mudança na coloração dos frutos. O teor de sacarose atingiu aproximadamente a metade da glicose ou frutose. As modificações no teor de carboidratos do flavedo estão mais relacionadas com o processo de maturação dos frutos que com as mudanças na sua susceptibilidade ao frio. O nível de amido aumentou durante a maturação dos frutos, porém o seu teor é bem menor que o dos outros carboidratos; e o início da degradação do amido coincidiu com a maturação comercial dos frutos.

Nos frutos mais maduros, a atividade da enzima SS foi maior do que a da SPS, o que sugere que a SS tenha atuado na clivagem da sacarose possibilitando o acúmulo de amido, glicose e frutose.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
02. CLAUSSEN, W.; LOVEYS, B. R.; HAWKER, J. S. Influence of sucrose and hormones on the activity of sucrose synthase and invertase in detached leaves and leaf sections of egg-plants (*Solanum melonena*). **Journal Plant Physiology**, v.124, p.345-357, 1986.
03. COOMBE, B. G. The development of fleshy fruits. **Annual Review of Plant Physiology**, v.27, p.507-528, 1976.
04. CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Starch breakdown during banana reaping: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.24, p.898-899, 1995.
05. DUBOIS, M.; GILLES, K. A; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, 1956.
06. ECHEVERRIA, E.; VALICH, J. Enzymes of sugar and acid metabolism in stored 'Valencia' oranges. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.114, p.445-449, 1989.
07. EILATI, S. L.; BUDOWSKI, P.; MONSELISE, S. P. Carotenoid changes in the "Shamouti" orange peel during chloroplast-chromoplast transformation on and off the tree. **Journal of Experimental Botany**, v.26, p.624-632, 1975.
08. GEIGENBERGER, P.; STITT, M. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. **Planta**, v.189, p.329-339, 1993.
09. GOLDSCHMIDT, E. E. Regulatory aspects of chloro-chromoplast interconversions in senescing *Citrus* fruit peel. **Israel Journal of Botany**, v.37, p.123-130, 1988.
10. GOREN, R.; MONSELISE, S. P. Morphological features and changes in nitrogen content in developing Shamouti orange fruits. **Israel Journal of Agricultural Research**, v.14, p.65-74, 1964.
11. HUBBARD, N. L.; HUBER, S. C.; PHARR, D. M. Sucrose phsphate synthase and acid invertase as determinants of sucrose concentration in developing muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruits. **Plant Physiology**, v.91, p.1527-1534, 1989.

12. HUBER, S. C. Biochemical mechanism for regulation of sucrose accumulation in leaves during photosynthesis. **Plant Physiology**, v.91, p.656-662, 1989.
13. HUFF, A. Sugar regulation of plastid interconversions in epicarp of citrus fruit. **Plant Physiology**, v.76, p.307-312, 1984.
14. IRVING, D. E.; HURST, P. L.; RAGG, J. S. Changes in carbohydrates and carbohydrate metabolizing enzymes during the development, maturation, and ripening of buttercup squash (*Curcubita maxima* D. 'Delica'). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.122, n.3, p.310-314, 1997.
15. KIMBALL, D. A. Factors affecting the rate of maturation of citrus fruits. **Proceedings Florida State Horticultural Society**, v.97, p.40-44, 1984.
16. KOMATSU, A.; TAKANOKURA, Y.; OMURA, M.; AKIHAMA, T. Cloning and molecular analysis of cDNAs encoding three sucrose phosphate synthase isoforms from a citrus fruit (*Citrus unshiu* Marc.). **Mol Gen. Genet.** 1996.
17. LAFTA, A M.; LORENZEN, J. H. Effect of high temperature on plant growth and carbohydrate metabolism in potato. **Plant Physiology**, v.109, p.637-643, 1995.
18. LAFUENTE, M. T.; MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. A.; ZACARÍAS, L. Absciscic acid in the response of 'Fortune' mandarins to chilling. Effect of maturity and high-temperature conditioning. **Journal Science of Food Agricultural**, v.73, p.494-502, 1997.
19. LAVON, R.; GOLDSCHMIDT, E. E.; SALOMON, R.; FRANK, A. Effect of potassium, magnesium, and calcium deficiencies on carbohydrate pools and metabolism in *Citrus* leaves. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.120, n.1, p.54-58, 1995.
20. LOWELL, C. A.; TOMLINSON, P. T.; KOCH, K. E. Sucrose-metabolizing enzymes in transport tissues and adjacent sink structures in developing citrus fruit. **Plant Physiology**, v.90, p.1394-1402, 1989.
21. McCREADY, R. M. Carbohydrates: composition, distribution, significance. In: **Citrus Science and Technology**, (eds. S. Nagy, P. E. Shaw and M. K. Veldhuis), Westport: AVI Publishing, Inc., 1977, v.1, p.74-109.
22. MIRON, D.; SCHAFFER, A A. Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase, and invertase activities in developing fruit of *Lycopersicon esculentum* Mill. And the sucrose accumulating *Lycopersicon hirsutum* Humb. and Bonpl. **Plant Physiology**, v.95, p.623-627, 1991.
23. ORTIZ, J. M.; TADEO, J. L.; ESTELLÉS, A; GARCÍA, T. La maduración de las clementinas (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.). Estudio comparativo de los cultivares 'Fina', 'Oroval' y 'Hernandina'. **Comunicaciones I.N.I.A Serie: Producción Vegetal**, n.45, p.1-20, 1982.

24. PHAN, C-T. Photosynthetic activity of fruit tissues. **Plant and Cell Physiology**, v.11, p.823-825, 1970.
25. PREISS, J. Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. **Annual Review of Plant Physiology**, v.33, p.431-454, 1982.
26. PURVIS, A C.; KAWADA, K.; GRIERSON, W. Relationship between midseason resistance to chilling injury and reducing sugar level in grapefruit peel. **HortScience**, v.14, n.3, p.227-229, 1979.
27. RYALL, A L.; LIPTON, W. J. **Handling, Transportation and Storage of Fruits and Vegetables**. 2ed. Westport: Avi Publishing, 1979, v.1, 587p.
28. SANZ, A; GUARDIOLA, J. L. Amylases from orange leaves. Characterization and relation to starch breakdown. **Plant Physiology**, v.7, p.85-89, 1988.
29. SCHAFFER, A. A.; GOLDSCHMIDT, E. E.; GOREN, R.; GALILI, D. Fruit set and carbohydrate status in alternate and nonalternate bearing citrus cultivars. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.110, p.574-578.
30. TADEO, J. L.; ORTIZ, J. M.; ESTELLES, A. Sugar changes in clementine and orange fruit during ripening. **Journal of Horticultural Science**, v.62, n.4, p.531-537, 1987.
31. TING, S. V.; ATTAWAY, J. A. Citrus fruits. In: **The Biochemistry of Fruits and Their Products**. (ed. A C. Hulme), London: Academic Press, 1971, v.2, p.107-169.
32. TUCKER, G. A. Introduction. In: Seymour, G. B.; Taylor, J. E.; Tucker, G. A. **Biochemistry of fruit ripening**, 2^a ed, London: Chapman & Hall, 1996. cap.4: p.1-43.
33. ULRICH, R. Organic acids. IN: **The biochemistry of fruits and their products**. (ed. A C. Hulme), London: Academic Press, 1970, v.1, p.89-118.
34. VERCHER, R.; TADEO, F. R., ALMELA, V.; ZARAGOZA, S.; PRIMOMILLO, E., AGUSTÍ, M. Rind structure epicuticular wax morphology and water permeability of 'Fortune' mandarin fruits affected by peel pitting. **Annual Botany**, v.74, p.619-625, 1994.
35. VIOLA, R.; DAVIES, H. V.; CHUDECK, A R. Pathways of starch and sucrose biosynthesis in developing tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) and seeds of faba bean (*Vicia faba* L.). **Planta**, v.183, p.202-208, 1991.
36. WALKER, A J.; HO, L. C.; BAKER, D. A. Carbon translocation in the tomato: pathways of carbon metabolism in fruit. **Annual Botany**, v.42, p.901-909, 1978.

37. WANG, F.; SANZ, A; BRENNER, M. L.; SMITH, A Sucrose synthase, starch accumulation, and tomato fruit sink strength. **Plant Physiology**, v.101, p.321-327, 1993.
38. YELENOSKY, G.; GUY, C. L.; Carbohydrate accumulation in leaves and stems of 'Valencia' orange at progressively colder temperatures. **Botanical Gazeta**, v.138, p.13-17, 1977.
39. YEN, C.; KOCH, K. E. Developmental changes in translocation and localization of ¹⁴C-labelled assimilates in grapefruit: light and dark CO₂ fixation by leaves and fruits. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.115, p.815-819, 1990.
40. YOMAKI, Y. T. Organic acids in the juice of citrus fruits. **Journal of Japanese Society of Horticultural Science**, v.58, p.587-594, 1989.
41. XU, D-P.; SUN, S. S.; BLACK, C. C. Sucrose metabolism in lima bean seeds. **Plant Physiology**, v.89, p.1106-1116, 1989.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO DE CURA NA SUSCEPTIBILIDADE À INJÚRIA PELO FRIO E NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DE TANGERINAS ‘FORTUNE’

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO DE CURA NA SUSCEPTIBILIDADE À INJÚRIA PELO FRIO E NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DE TANGERINAS 'FORTUNE'

RESUMO

Frutos tangerina 'Fortune' foram colhidos em 1993/94 e 96/97 em três diferentes estádios de maturação do pomar em Sagunto, Valência - Espanha. Metade dos frutos foi submetida ao acondicionamento por 3 dias em câmara a 37°C (tratamento de cura) e 90-95% de umidade relativa (UR). As tangerinas com ou sem cura foram armazenadas a 2 e 12°C com 90-95% UR. Após 0, 7, 14, 21 e 28 e 0, 10, 20 e 30 dias de armazenamento foram obtidas amostras do flavedo de 93/94 e 96/97, respectivamente. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a efetividade do tratamento de cura na prevenção de injúrias no flavedo e verificar a relação da modificação dos carboidratos de frutos submetidos ou não ao tratamento de cura e armazenados a temperaturas de 2 e 12°C, com a resposta de proteção ao estresse. Para tanto foram realizadas as seguintes análises do flavedo: índice de danos pelo frio do flavedo, quantificação de sacarose, glicose, frutose e amido e determinação das atividades das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS) e sacarose sintase (SS) para os frutos de 93/94 e 96/97; análises de perda de massa e produção de CO₂ e etileno para os frutos de 96/97. No estágio I de maturação os frutos perderam mais peso a 12°C, enquanto nos estádios II e III perderam mais peso a 2°C. Durante a cura houve maior produção de CO₂ e etileno. Os frutos com ou sem cura produziram mais CO₂ quando armazenados a 12°C, e a 2°C os frutos curados produziram menos CO₂. Houve a elevação de etileno de frutos não curados e armazenados a 2°C, porém não parece estar diretamente relacionado com os sintomas de injúria pelo frio. O tratamento de cura impediu as injúrias no flavedo provocadas pelo frio. A sacarose, glicose e frutose aumentaram do estágio I de maturação para o estágio II e diminuíram no estágio III, enquanto o amido apresentou aumento crescente. Com a cura a sacarose variou de maneira diferente nos distintos estádios e anos analisados, enquanto os açúcares redutores e amido diminuíram. Em frutos curados e armazenados a 2°C a sacarose se manteve mais elevada e a glicose e frutose mais baixas. Evidências sugerem que a sacarose, entre outros

fatores, exerceu um papel protetor frente ao mecanismo de injúria pelo frio. As atividades das enzimas SPS e SS foram maiores a 2°C do que a 12°C.

INFLUENCE OF CONDITIONING ON THE SUSCEPTIBILITY TO CHILLING INJURY AND ON CARBOHIDRATE METABOLISM OF 'FORTUNE MANDARINS

SUMMARY

'Fortune' mandarins at three different maturation stages, were harvested in 1993/94 and in 1996/97 from an orchard in Sagunto, Valence - Spain. Half of the fruits were submitted to conditioning for 3 days at a temperature of 37°C (curing) and relative humidity (R.H.) of 90-95%. All the mandarins, with or without curing, were stored at both 2°C and 12°C and 90-95% R.H. Samples of flavedo were removed after 0, 7, 14, 21 and 28 days of storage for the 93/94 fruits and after 0, 10, 20, and 30 days of storage for the 96/97 fruits. The objectives of this work were to evaluate the effect of curing in preventing cold damage to the flavedo and to determine any relation between changes in the carbohydrates of cured and non-cured fruits stored at temperatures of 2°C and 12°C, as a protective response to the stress. Thus the following analyses were carried out on the flavedo samples of the 93/94 and 96/97 fruits: cold damage index, quantification of sucrose, glucose, fructose and starch contents and determinations of the activities of the enzymes sucrose phosphate synthase (SPS) and sucrose synthase (SS); loss in weight and production of CO₂ and ethylene were determined in the 96/97 fruits. In maturation stage I, the fruits lost more weight at 12°C, while in stages II and III they lost more weight at 2°C. During curing, there was a greater production of CO₂ and ethylene. Both cured and non-cured fruits produced more CO₂ when stored at a temperature of 12°C, the cured fruits producing less CO₂ at 2°C. There was an increase in ethylene production in unconditioned fruits stored at a temperature of 2°C, although this did not seem to be directly related to the cold damage symptoms. Curing prevented cold damage of the flavedo. The sucrose, glucose and fructose contents increased from maturation stage I to stage II and decreased in stage III, while starch presented an increase. The response of sucrose concentration to curing varied at the different stages and years analyzed, while the contents of reducing sugars and starch decreased. In conditioned fruits, stored at 2°C, the sucrose content remained higher than the glucose and fructose contents. The evidence suggests that

sucrose, amongst other factors, has a protective function with respect to cold damage. Both SPS and SS activities were higher in fruits stored at 2°C than at 12°C.

3.1. INTRODUÇÃO

A tangerineira Fortune é uma cultivar tardia, apresenta alta produtividade e possibilita a extensão do comércio das tangerinas, assim como bons preços ao produtor. Os frutos são de sabor muito apreciado pelos consumidores, porém são considerados muito susceptíveis à injúria pelo frio, tanto no campo como no armazenamento.

A injúria pelo frio é causada principalmente em frutos e hortaliças de origem tropical ou subtropical expostos a baixas temperaturas, mas não temperaturas de congelamento (WANG, 1982). A injúria provocada pelo frio pode levar ao desenvolvimento de sintomas visíveis no fruto. Nas tangerinas 'Fortune' estes sintomas se caracterizam por depressões e manchas escuras no flavedo (CUQUERELLA *et al.* 1990).

Vários tipos de pré-tratamentos têm sido utilizados para minimizar ou até evitar os danos pelo frio em vegetais que serão armazenados sob baixas temperaturas. Dentre eles, tem-se utilizado com sucesso o tratamento de cura (3 dias a 37°C) para muitos frutos, inclusive para as tangerinas 'Fortune' (GONZÁLEZ-AGUILAR, 1995; LAFUENTE *et al.*, 1997). O estresse pelo calor induz a uma variedade de mudanças bioquímicas que podem ajudar a adaptação ao estresse (LURIE *et al.*, 1995).

Tem-se observado que a aclimação de plantas em baixas temperaturas aumenta a tolerância destas ao frio. Este aumento da tolerância tem sido associado à biossíntese de crioprotetores. Dentre estes estão os dissacarídeos e trissacarídeos; o poliol sorbitol; compostos quaternários de amônia, glicinobetaína; prolina e poliaminas (YANCEY *et al.*, 1982). Destes, a sacarose é o mais largamente encontrado em plantas tolerantes ao congelamento; seu nível pode aumentar dez vezes durante a exposição à baixa temperatura (SALERNO & PONTIS, 1989). De acordo com PURVIS (1990) os carboidratos solúveis podem ter uma função direta ou indireta na proteção dos constituintes celulares de plantas sensíveis a temperaturas de resfriamento. Eles podem influir no mecanismo de resistência ao resfriamento por pelo menos três maneiras: a) os carboidratos contribuem para o potencial osmótico da célula diminuindo o potencial de água e reduzindo a perda de água do tecido; b) certos carboidratos podem estabilizar as membranas e enzimas celulares pela ligação direta às moléculas constituintes; c) servem como fonte de energia para as células das plantas.

Em condições de outros tipos de estresses, como o mecânico, KELLER & STEFFEN (1995) observaram que houve aumento de açúcares solúveis e maior tolerância ao frio em folhas de tomates, enquanto sob tratamentos a altas temperaturas LAFTA & LORENZEN (1995) verificaram que em plantas de batatas houve a elevação da síntese de açúcares e da atividade da sacarose fosfato sintase (SPS).

Considerando-se as respostas a estresses mencionadas anteriormente, no presente trabalho pretende-se avaliar se os carboidratos também exercem um importante papel para o sucesso do tratamento de cura utilizado com a finalidade de evitar as injúrias pelo frio. Portanto o presente trabalho tem como objetivos: a) verificar se o tratamento de cura altera o conteúdo dos açúcares; b) verificar as mudanças nos níveis de carboidratos de frutos submetidos ou não a cura e armazenados ou não em temperatura que resulte na injúria pelo frio; c) determinar a atividade de enzimas de síntese e degradação dos carboidratos dos frutos curados ou não e armazenados em diferentes temperaturas.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal

Foram realizadas coletas dos frutos em 02/12/93, 13/01 e 28/02 de 1994 e novas coletas nas datas de: 09/12/96, 27/01/97 e 03/03/97 do pomar em Sagunto, Valência - Espanha. Todos os frutos colhidos nestas respectivas datas, em três diferentes estádios de maturação, sofreram os tratamentos de temperatura (cura e/ou armazenamento). Após o transporte de cerca de 1000 tangerinas ao IATA (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos) estas foram selecionadas e homogeneizadas, eliminando-se as que apresentavam injúrias e separadas ao acaso em 3 repetições de 10 frutos para cada tempo da coleta de amostras e para cada tratamento de temperatura. Parte dos frutos foi acondicionada em câmara a 37°C a 90-95% de umidade relativa (UR), por três dias (cura) e posteriormente armazenada em câmaras a 2°C e 12°C com 80-85% UR, por 30 dias. A outra parte dos frutos foi armazenada diretamente a 2°C e 12°C. Após 0 (controle), 7, 14, 21 e 28 e 0, 10, 20 e 30 dias de armazenamento foram retiradas amostras das tangerinas colhidas no ano de 93/94 e 96/97, respectivamente, para as análises do flavedo. Os flavedos obtidos foram picados, homogeneizados, acondicionados em embalagens plásticas (PVC), congelados com nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

Para cada tratamento (ausência ou presença de cura seguido de armazenamento a 2 e 12°C), foram separados ao acaso, 30 frutos para a análise visual do grau de danos provocados pelo frio. Também foram utilizadas 48 tangerinas em cada colheita para as análises de etileno e CO₂, uma vez que se utilizou 3 repetições de 4 frutos em cada jarra para cada um dos 4 tratamentos de temperatura.

No pomar de Sagunto, as temperaturas mínimas e máximas e umidades relativas médias dos meses de dezembro, janeiro e fevereiro de 1993/94 foram, respectivamente: 4,07, 18,26°C; 3,69, 17,00°C e 5,17, 18,90°C; 61,90%, 54,04% e 52,91%. E em 1996/97 foram, respectivamente: 6,70, 16,86°C; 6,47, 14,95°C e 5,15, 18,87°C; 67,48%, 69,61% e 64,75%.

3.2.2. Delineamento experimental e análises estatísticas

Trata-se de um experimento fatorial completo 2 x 2 x 5, utilizando-se blocos casualizados e considerando-se blocos os três estádios de maturação. Os fatores avaliados foram: pré-tratamento (com e sem cura), temperatura (2 e 12°C) e tempos de armazenamento (0, 7, 14, 21 e 28 dias para 93/94 e 0, 10, 20 e 30 dias para 96/97).

Os efeitos principais e os efeitos de interação dos tratamentos foram avaliados através da análise da variância (ANOVA) dos resultados experimentais.

Na avaliação de possíveis relações causa-efeito entre os diversos parâmetros estudados foi feita a análise de correlação.

Para a análise dos dados foi utilizado o programa “Statistica versão 5.0”.

3.2.3 Análises realizadas nos experimentos de 96/97

3.2.3.1. Perda de Massa

Foi avaliado o peso inicial (antes do armazenamento) de 30 frutos de cada tratamento e a cada 7 dias de armazenamento. O resultado final foi dado em porcentagem de perda de massa em relação à massa inicial.

3.2.3.2. Escala subjetiva de danos por frio no flavedo

Os danos pelo frio nas tangerinas foram avaliados como está descrito no capítulo 2.

3.2.3.3. Determinação dos gases etileno e dióxido de carbono (CO₂)

Foram colocados 4 frutos em cada uma das 3 jarras (representando 3 repetições), para os tratamentos de temperatura. No início do experimento e a cada 7 dias durante o armazenamento as jarras foram lacradas durante 3 horas, e após este tempo, foram coletadas 4 amostras de cada repetição (2 para análise de etileno e 2 para CO₂), com seringas de 1 ml, através de um pequeno septo de borracha adaptado nas jarras. No tratamento de cura foram coletadas amostras nos 3 dias consecutivos. Para a determinação dos gases, além das amostras, foram injetadas também no cromatógrafo a gás padrões de 1 ml de etileno e CO₂, com concentrações de 1 ppm (mm³/l) e 0,5%, respectivamente. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso da marca Perkin Elmer (autosystem-gas chromatograph) e integrador Hewlett Packard-3390/A. Para determinar o etileno foi utilizado uma coluna de óxido de alumínio ativado de 1 m de comprimento e 2 mm de diâmetro interno, e detector de ionização de chama (FID); para o CO₂ uma coluna “Chromosorb 102” de 1,5 m de comprimento e 2 mm de diâmetro interno, e detector de condutividade térmica. As condições utilizadas foram:

- temperatura da coluna: 140°C (etileno) e 60°C (CO₂)
- temperatura do injetor: 150°C - para os dois gases
- temperatura do detector: 200°C - para os dois gases
- atenuação: 1 (etileno) e 4 (CO₂)
- tempo de retenção: 58 segundos - para os dois gases

O cálculo foi efetuado através das seguintes fórmulas:

$$\text{Etileno: } \text{nl/g.h} = \frac{(\text{área amostra})}{(\text{área padrão})} \cdot 1 \cdot \frac{(\text{vol. frasco (ml)} - \text{vol. frutos (ml)})}{(\text{peso frutos (g)} \cdot \text{tempo (horas)})}$$

$$\text{CO}_2: \text{ ml/ g.h} = \frac{(\text{área amostra})}{(\text{área padrão})} \cdot 0,005 \cdot \frac{(\text{vol. Frasco (ml)} - \text{vol. Frutos (ml)})}{(\text{peso frutos (g)} \cdot \text{tempo (horas)})}$$

3.2.4. Análises químicas realizadas nos experimentos de 93/94 e 96/97

As extrações e determinações de carboidratos do flavedo (sacarose, glicose, frutose e amido), de atividades das enzimas SPS e SS, assim como de proteínas totais, foram realizadas como descritas no capítulo 2.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Injúria pelo frio

A Figura 1 demonstra que os frutos não curados e armazenados sob temperatura de 2°C foram os que apresentaram maior índice de injúrias ou danos por frio, sendo os frutos menos maduros os mais susceptíveis nos anos de 1996/97.

Apesar dos frutos de tangerina ‘Fortune’ serem considerados muito susceptíveis aos danos pelo frio, esta susceptibilidade vem diminuindo a cada ano. Na colheita do ano de 1992/93 os frutos se mostraram mais sensíveis ao frio que na colheita de 1993/94 e estes mais sensíveis que os frutos colhidos em 1996/97.

Não foi comprovado uma relação entre a maior ou menor susceptibilidade ao frio com o estágio de maturação das tangerinas ‘Fortune’. Em 1996/97, após 28 dias de armazenamento a 2°C os frutos apresentaram os seguintes índices de danos pela escala subjetiva: 1,4; 0,67 e 0,8 nos estádios de maturação I, II e III, respectivamente, enquanto para a colheita de 93/94 foi de 1,3; 2,3 e 2,6 (LAFUENTE *et al.*, 1997). Através da Figura 1, pode-se observar que os frutos menos maduros colhidos em 09/12/96, apresentaram maior índice de danos pelo frio do que os do estágio II de maturação (27/01/97) e estes um pouco maior aos frutos do estágio III (03/03/97). Por esta diferença nos resultados obtidos entre uma colheita e outra, as variações climáticas nos respectivos anos das colheitas parecem exercer um papel mais importante na susceptibilidade ao frio do que o estágio de maturação, como descrevem HOUCK *et al.* (1990) e UNDERHILL *et al.* (1995).

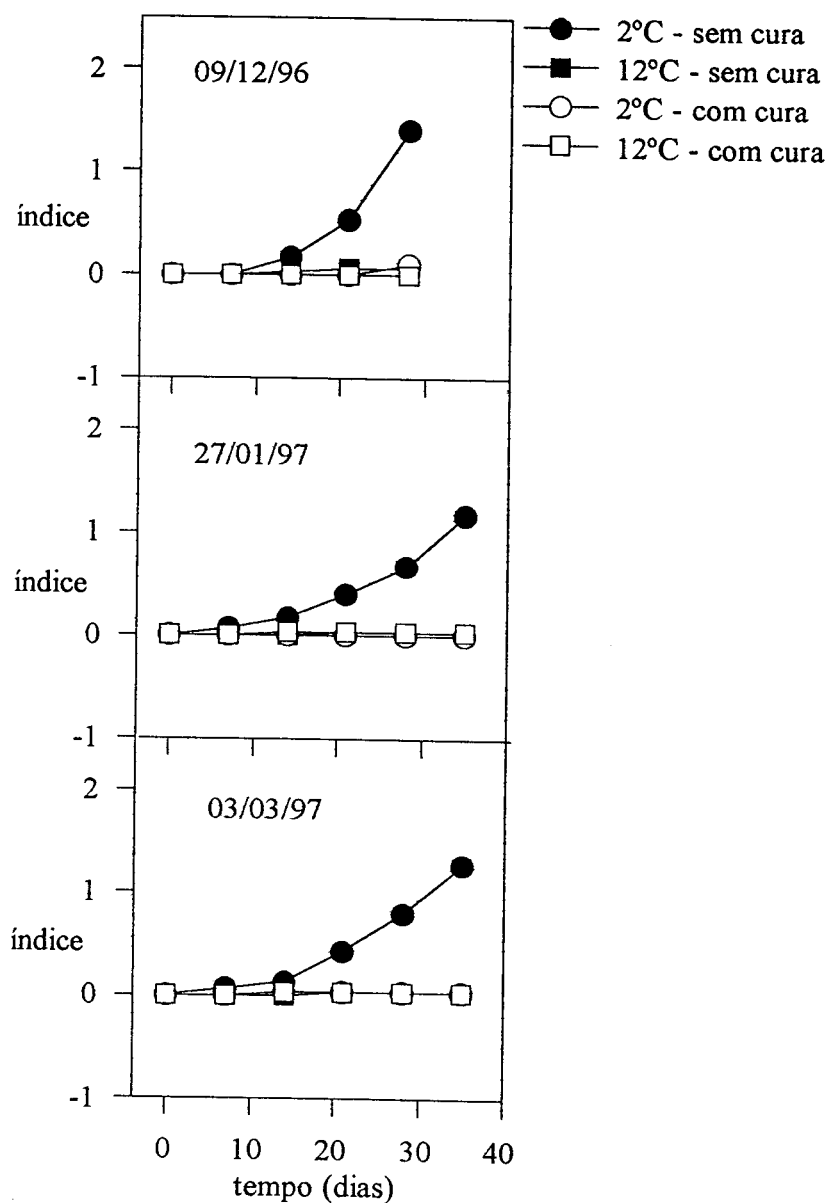


Figura 1: Índice de danos por frio, em três estádios de maturação, durante o armazenamento refrigerado de tangerinas 'Fortune' com e sem cura.

As variáveis pré-tratamento (com e sem cura) e temperatura (2 e 12°C), apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) pelo teste F, assim como a interação entre estas duas variáveis. Isto porque o índice de danos pelo frio somente apresentou elevação

nas tangerinas 'Fortune' não curadas e armazenadas a 2°C. Esta elevação do índice de danos devido ao aparecimento de depressões tipo necroses e escurecimento do flavedo foi se acentuando com o tempo de exposição ao frio, isto é, durante o tempo de armazenamento ($p < 0,05$).

A eficiência do tratamento de cura para reduzir os danos pelo frio foi comprovada em cotilédones de pepino (LAFUENTE *et al.*, 1991), em tomates (LURIE & KLEIN, 1991) e mais tarde nas próprias tangerinas 'Fortune' (MARTÍNEZ-JÁVEGA *et al.*, 1994 e LAFUENTE *et al.*, 1997).

3.3.2. Perda de massa

Houve efeito significativo ($p < 0,05$) na interação entre estágio de maturação e temperatura de armazenamento (2 e 12°C) para a característica perda de massa. Os frutos colhidos em 09/12/1996 apresentaram maior perda de massa das tangerinas 'Fortune' (Figura 2), e os tratamentos que mais perderam massa foram os armazenados à temperatura de 12°C, principalmente após 20 dias de armazenamento. Enquanto que as tangerinas mais maduras, colhidas em 27/01/97 e 03/03/97 e armazenadas a 2°C, foram as que mais perderam massa. A maior perda de massa de frutos armazenados a 2°C do que a 12°C foi verificada por PURVIS (1984) e LURIE & SABEHAT (1997), e atribuída ao desenvolvimento da injúria pelo frio. Assim como tem-se reportado uma perda de massa inicial devido ao pré-tratamento pelo calor antes dos frutos serem armazenados a 2°C (SCHIRRA & D'HALLEWIN, 1997).

No estágio de maturação I a maior perda de massa a 12°C justifica a não correlação entre danos por frio e perda de massa. Enquanto os estádios II e III de maturação apresentaram correlação positiva significativa ($p < 0,05$) entre danos por frio e perda de massa para frutos não curados com $r = 0,79$ e $0,77$, respectivamente. A menor perda de massa no estágio de maturação I de frutos armazenados a 2°C e com maior índice de danos por frio, pode estar associada ao menor grau de maturidade das tangerinas, o qual permite um distinto teor ou composição da cera que normalmente reveste o flavedo dos frutos. Nos cítricos tem-se demonstrado que o teor total de ceras aumenta com a maturação (EL-OTMANI & COGGINS, 1985). Neste trabalho, a maior

perda de massa a 12°C do que a 2°C deve estar relacionada com a velocidade da perda de massa a 12°C do que a 2°C deve estar relacionada com a velocidade da respiração dos frutos, a qual foi maior a 12°C. Nas tangerinas mais maduras (estádios II e III) a maior perda de massa dos frutos não curados correspondeu aos armazenados a 2°C, os quais apresentaram danos por frio.

Não houve diferença na perda de massa ocorrida durante os 3 dias de cura a 37°C dos frutos colhidos em distintos estádios de maturação. Nos três estádios a perda foi de 1%, porém observou-se que os frutos menos maduros, colhidos em 09/12/96, apresentaram maior perda de massa durante o armazenamento a 12°C. Nos três dias de cura houve aumento da respiração das tangerinas com conseqüente transpiração e maior perda de massa; já quando estas foram armazenadas a 2 ou 12°C houve redução na respiração e na perda de massa, quando comparadas com as não curadas. Os frutos curados não sofreram injúria pelo frio durante o armazenamento a 2°C, porém perderam mais massa que os curados e armazenados a 12°C. Baixas temperaturas já foram responsabilizadas por VERCHER *et al.* (1994) em aumentarem acentuadamente a permeabilidade da cutícula para a perda de água. Por outro lado, demonstrou-se que o conteúdo de cera epicuticular no final do armazenamento a 2°C, em pomelos susceptíveis aos danos por frio, foi inferior ao dos frutos armazenados sob temperatura controle (NORBY & McDONALD, 1995). Do mesmo modo se tem comprovado que nas tangerinas 'Fortune' diminui a 2°C, mas não a 12°C, os níveis de um mRNA, o qual codifica para uma proteína transportadora de fosfolípídeos (LTP) responsável pela síntese de ceras epicuticulares, e que esta diminuição é maior nos frutos mais maduros (SÁNCHEZ-BALLESTA, 1998). Nos frutos menos maduros colhidos em dezembro, ao contrário, não se observaram mudanças na expressão deste mensageiro. Tendo-se em conta que uma das funções das ceras epicuticulares é evitar a desidratação dos frutos, seria portanto, interessante determinar se as diferenças de massa encontradas a 2°C e a 12°C nos frutos mais maduros poderiam estar relacionadas em parte com as modificações no teor destas.

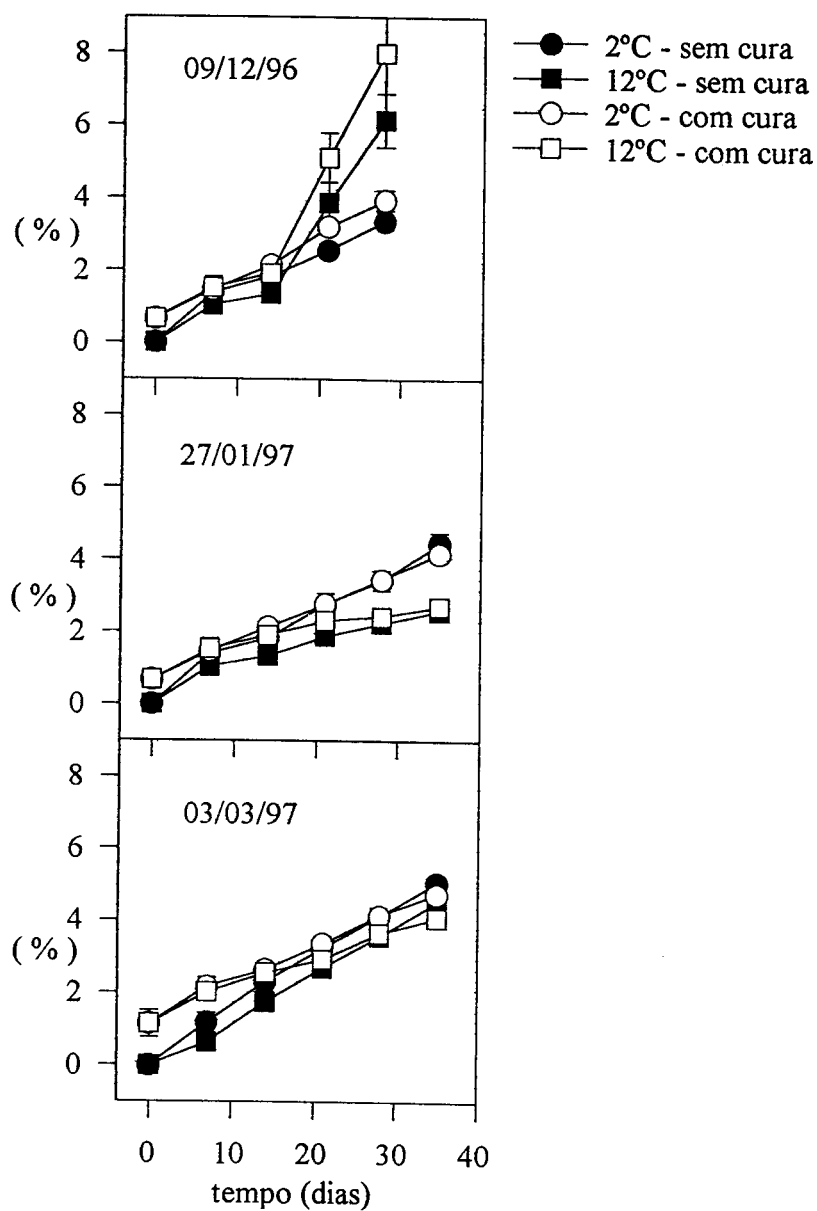


Figura 2: Perda de massa (%), em três estádios de maturação, durante o armazenamento refrigerado de tangerinas 'Fortune' com e sem cura.

Em todos os tempos de armazenamento nos três estádios de maturação, houve um aumento ($p < 0,05$) da perda de massa. Mesmo quando colocados sob condições ideais os

frutos sofrem alguma perda de massa durante o armazenamento devido ao efeito combinado da respiração e da transpiração.

3.3.3. Produção de CO₂

Através da Figura 3 verifica-se que os frutos colhidos mais maduros apresentaram maior produção de CO₂ no “tempo zero”. Não se trata de um aumento acentuado, pois as tangerinas são frutos não climatéricos. Além disso, esse aumento em CO₂ poderia estar relacionado com a temperatura dos frutos no momento em que foram colhidos.

Com o tratamento de cura houve um aumento na respiração dos frutos, o que também foi confirmado por LURIE *et al.*, (1995) em maçãs. Este aumento se produz como consequência do aumento na temperatura a que os frutos estão expostos, já que o coeficiente respiratório dos frutos é altamente dependente da mesma. Na Tabela 1 se comprova como o CO₂ aumentou durante o primeiro dia de exposição a 37°C e que para a mesma temperatura não existe diferença na taxa respiratória dos frutos colhidos nos três estádios de maturação. Depois do primeiro dia a taxa respiratória diminuiu ligeiramente, observando-se maior diminuição a 37°C nos frutos mais maduros. LURIE *et al.* (1995) reportaram que uma maior respiração de maçãs a 38°C/3 dias ocasionou perda de massa, já que o processo da respiração está associado ao da transpiração, ou seja eliminação de água com consequente perda de massa. O tratamento pelo calor estimula alguns processos associados com o amadurecimento, apesar de inibir outros (LURIE & KLEIN, 1990).

Na Figura 3, verifica-se que os valores de CO₂ diminuíram quando os frutos foram transferidos a 2 ou 12°C e que tanto nas tangerinas curadas como nas não curadas a respiração dos frutos armazenados a 12°C foi superior à dos frutos a 2°C. Nestas temperaturas a produção de CO₂ foi similar para os três estádios de maturação em que foram colhidos os frutos.

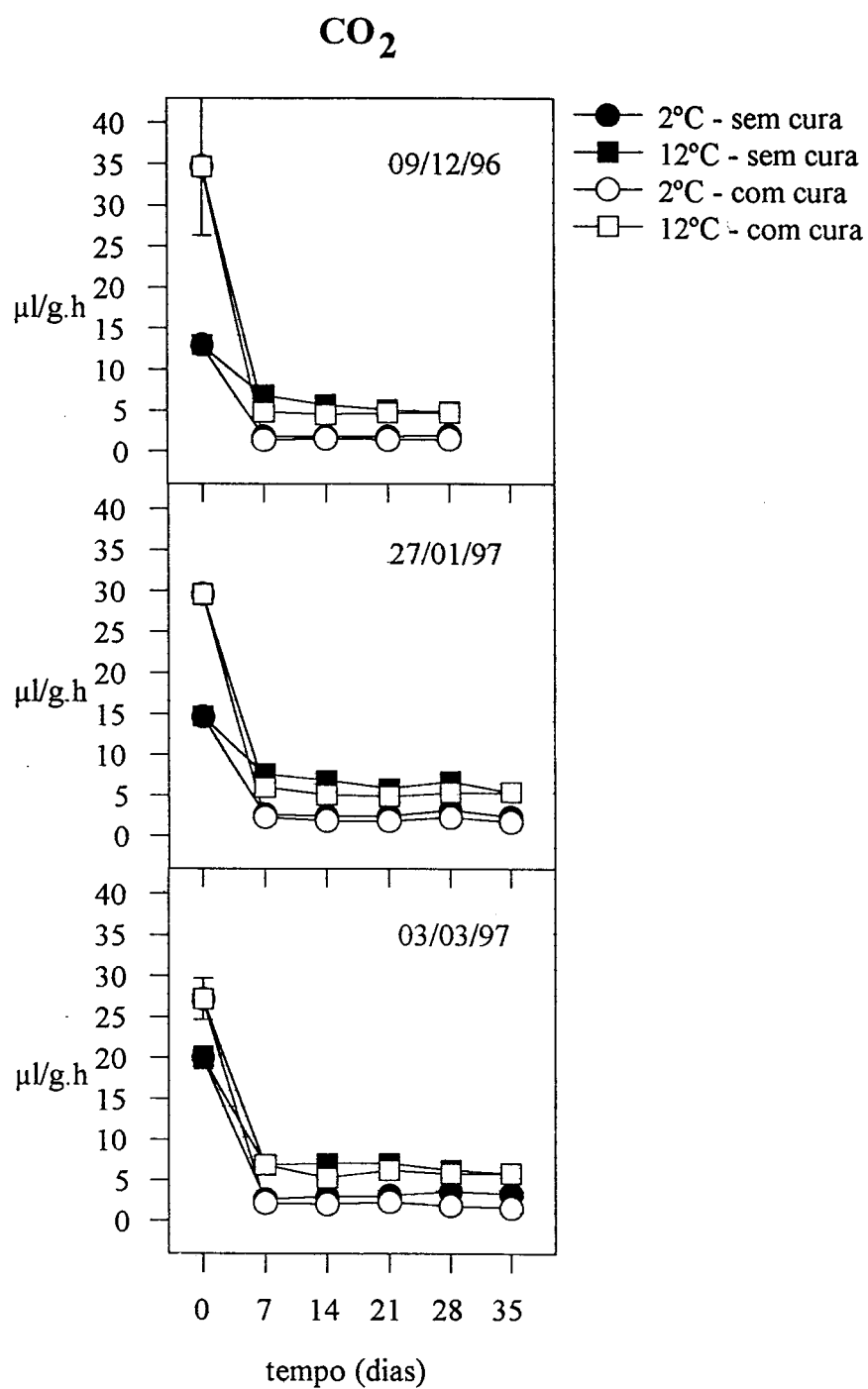


Figura 3: Produção de CO₂ ($\mu\text{l/g.h}$) de tangerinas 'Fortune', em três estádios de maturação durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura.

A variável temperatura apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) pelo teste F. Nos três estádios de maturação as tangerinas com e sem cura produziram mais CO_2 quando armazenadas a 12°C . Este fato pode, por exemplo, ser observado nos frutos não curados pelos valores de média de 1,9 e 4,8; 3,1 e 6,7; 3,6 e 6,2 $\mu\text{l/g.h}$ durante o armazenamento a 2 e 12°C , respectivamente. Assim se confirma que a redução da temperatura reduz o metabolismo dos frutos e a respiração é uma resposta primária a esse evento. ALIQUÉ *et al.* (1994) relataram queda nas taxas de respiração diretamente relacionada com a diminuição das temperaturas de 10, 8 e 6°C para o armazenamento de frutos *Annona cherimola* Mill.

Estádio de maturação	Tempo (dia)	Etileno (nl/g.h)	CO_2 ($\mu\text{l/g.h}$)
1° 09/12/96	0	0,0033 (0,0003)	12,97 (0,41)
	1°	0,024 (0,0027)	47,51 (2,60)
	2°	0,025 (0,0047)	43,33 (5,58)
	3°	0,027 (0,0035)	34,66 (8,31)
2° 27/01/97	0	0,0027 (0,0003)	14,70 (0,46)
	1°	0,053 (0,0168)	44,50 (2,75)
	2°	0,043 (0,0153)	41,83 (1,32)
	3°	0,037 (0,0165)	29,58 (1,29)
3° 03/03/97	0	0,0031 (0,0001)	20,03 (1,40)
	1°	0,082 (0,0199)	45,93 (4,52)
	2°	0,074 (0,0152)	37,42 (3,94)
	3°	0,189 (0,0210)	27,17 (2,53)

Tabela 1: Valores médios da produção de etileno e CO_2 , e seus respectivos desvios padrões, durante os 3 dias de cura.

O aumento na produção de CO_2 é um dos sintomas que se tem com as injúrias ou danos por frio em distintos tecidos vegetais (WANG, 1982). Entretanto, no presente trabalho os dados indicam que nas tangerinas 'Fortune' a taxa respiratória dos frutos com danos, armazenados a 2°C , é inferior a dos frutos armazenados a 12°C (temperatura

controle ou que não causa danos no flavedo), e que para a mesma temperatura de armazenamento (2°C), a respiração dos frutos curados, os quais não apresentam danos, é similar a dos não curados.

Análises químicas realizadas após o terceiro dia de cura das tangerinas, mostraram queda na acidez, °Brix e aumento no pH, quando comparadas com as análises realizadas nos frutos recém coletados, apresentando valores de 1,37% e 1,47% de ácido cítrico/100g; 12,23 e 13,17 °Brix; 3,33 e 3,20, respectivamente. Isto indica que os açúcares e ácidos foram utilizados na respiração. Ambos são os dois maiores substratos respiratórios em frutos, entretanto os açúcares são os substratos predominantes na respiração dos frutos (TUCKER & GRIERSON, 1987).

3.3.4. Produção de etileno

A produção de etileno aumentou quando os frutos foram expostos a 37°C (Tabela 1), sendo este fato acentuado ao longo da maturação, principalmente no estágio III de maturação, onde houve aumento de etileno de quase cinco vezes em relação ao estágio II, com valores de média de 0,189 e 0,037 nl/g.h, respectivamente. Nos estádios I e II a produção de etileno aumentou claramente depois do primeiro dia de cura, mas depois de dois dias a 37°C nos frutos do estágio I não houve alteração e nos do estágio II diminuiu ligeiramente.

KUZNETSOV *et al.* (1993) verificaram rápida e intensiva liberação de etileno por plantas de algodão quando submetidas a 47°C/3 horas. A produção de etileno, entre outras respostas ao calor, foi responsabilizada pelo aumento da resistência destas plantas à alta salinidade. Enquanto que ATTA-ALY (1992) observou que tomates mantidos a 35°C, o nível do ácido 1-aminociclopropano-1- carboxílico (ACC) aumentou agudamente, porém a produção de etileno diminuiu, indicando a inativação de ACC oxidase. Em estudo também com tomates, LURIE *et al.* (1996) reportaram que altas temperaturas igualmente afetaram a síntese de ACC oxidase pela grande diminuição de mRNA. Como nas tangerinas 'Fortune' foi identificado um aumento na liberação de etileno, seria interessante verificar o que ocorre com o ACC e a ACC oxidase durante a permanência dos frutos a 37°C/3 dias.

Houve efeito significativo ($p < 0,05$) pelo teste F tanto para a variável temperatura quanto para a interação desta com a variável pré-tratamento (com ou sem cura), ou seja, a

produção de etileno foi significativamente maior a 2°C e em frutos não curados colhidos em janeiro e março, mas não nos frutos menos maduros colhidos em dezembro (Figura 4). O nível de etileno dos frutos recém-colhidos ou durante o armazenamento a 12°C foi muito baixo. Somente nos estádios II e III de maturação é que se pode notar maior produção de etileno dos frutos que não sofreram cura e foram armazenados a 2°C, comparando-se aos que foram armazenados a 12°C, sendo que no último estágio houve um pico na produção de etileno com menor tempo de armazenamento sob refrigeração. Este aumento do hormônio etileno pode ser relacionado com o aparecimento do sintoma de danos pelo frio, que no caso trata-se de depressões e manchas escuras no flavedo dos frutos. Contudo, o estágio I não apresentou uma maior liberação de etileno, apesar de que estes frutos apresentaram sintomas de danos por frio mais severos do que os colhidos depois.

JOBLING *et al.* (1991) reportaram que a capacidade de converter ACC em etileno em maçãs 'Granny Smith' pré-climatéricas, é induzida mais rapidamente a temperaturas baixas (0 a 5°C), sendo que a temperatura baixa estimula antes a atividade da ACC oxidase do que a da ACC sintase. LELIÈVRE *et al.* (1995) identificaram que a quantidade da proteína ACC oxidase aumentou significativamente em maçãs 'Granny Smith' pré-climatéricas quando armazenadas a 4°C, com conseqüente aumento da produção de etileno.

McCOLLUM & McDONALD (1992) também detectaram aumento de etileno em pomelos armazenados a 5°C. Isto ocorreu depois de uma semana de armazenamento sob resfrieração e precedeu o surgimento dos sintomas de injúria pelo frio. Porém, LEDERMAN *et al.* (1997) não identificaram aumento da produção de etileno na casca de mangas 'Keitt', quando armazenadas em temperaturas que causam injúria pelo frio.

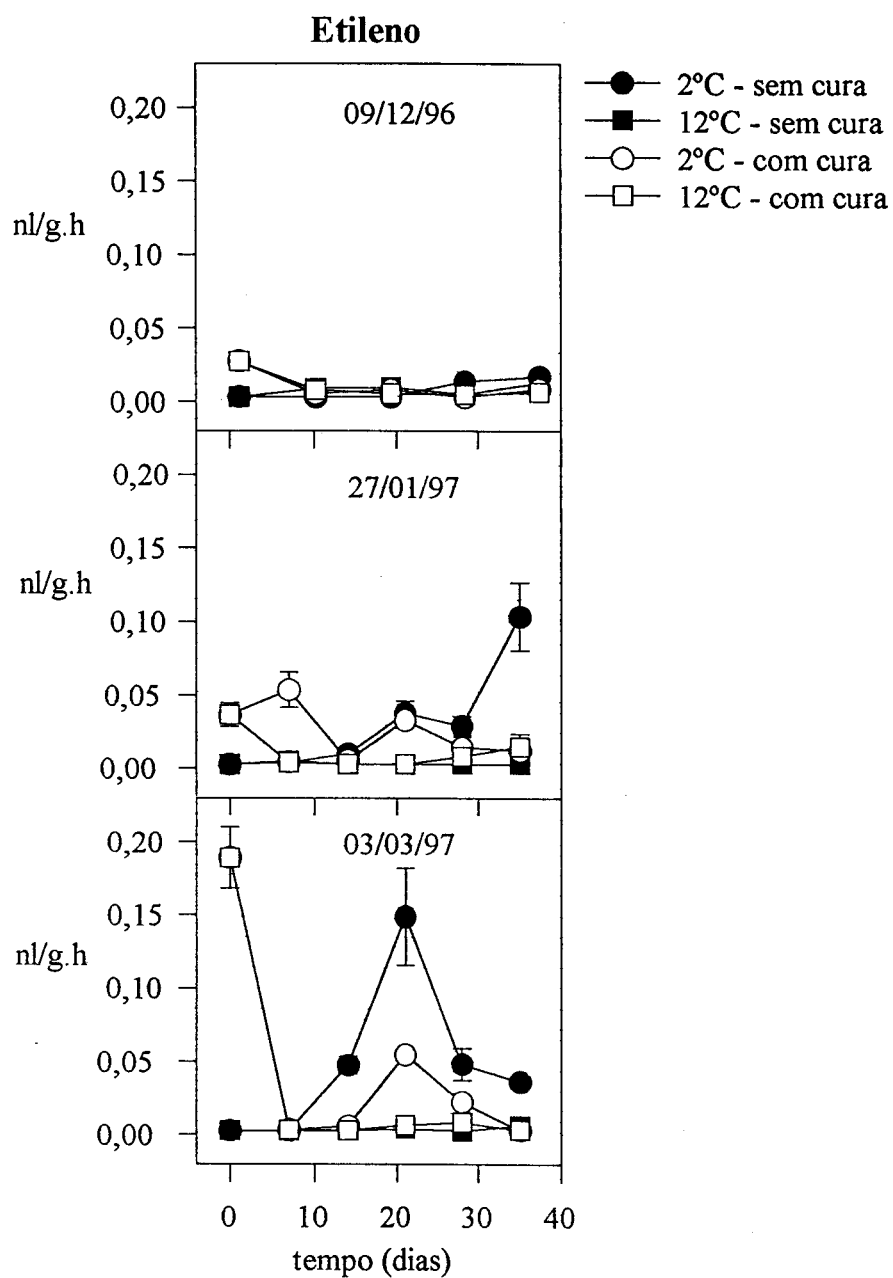


Figura 4: Produção de etileno (nl/g.h) de tangerinas 'Fortune', em três estádios de maturação, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura.

Um aumento substancial da produção de etileno foi observado por MARTÍNEZ-TÉLLEZ & LAFUENTE (1997), concomitantemente ao desenvolvimento de sintomas de injúria pelo frio em tangerinas 'Fortune'. Entretanto no presente trabalho, o aumento da produção de etileno não parece estar diretamente relacionado com o surgimento dos sintomas de injúria pelo frio, ou se tem alguma relação, esta depende da maturidade do fruto. Quanto mais maduras as tangerinas, maior a correlação do aumento da produção de etileno com o início do aparecimento dos sintomas de injúria ao resfriamento.

3.3.5. Carboidratos

Como se pode observar nas Figuras 5 e 6, assim como foi discutido no capítulo 2, os níveis de sacarose, glicose e frutose apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os estádios de maturação. Em 93/94 e 96/97 os açúcares aumentaram do estágio I para o estágio II de maturação e apresentaram pequena diminuição no estágio III. Em relação ao conteúdo de amido houve aumento contínuo com a maturação dos frutos ($p < 0,05$), porém o estágio I de 93/94 apresentou quantidade menor que o mesmo estágio de 96/97 e o estágio III de 93/94, ao contrário, apresentou teor maior de amido que o estágio III de 96/97 (Figura 7). Essas diferenças observadas entre os anos podem ser associadas às condições climáticas, fertilidade do solo e práticas agronômicas (TREVIÑO *et al.*, 1995).

Pelas Figuras 5 e 6 pode-se notar que com o tratamento de cura ($37^{\circ}\text{C}/3$ dias antes do armazenamento sob refrigeração) as concentrações de sacarose, em geral, diminuíram nos frutos colhidos em 96/97, enquanto nos frutos de janeiro e fevereiro de 94 não se pode dizer que houve variação no nível de sacarose, porém os frutos colhidos em dezembro de 93 apresentaram aumento. A redução no nível dos açúcares redutores e do amido foi mais acentuada com a cura das tangerinas 'Fortune', principalmente em 96/97 e no estágio II de 93/94, o que, portanto, pode estar diretamente relacionada com o aumento na produção de CO_2 em alta temperatura, ou seja, durante o tratamento de cura. Embora as plantas superiores utilizem a sacarose e o amido como os principais substratos para a glicólise, sabe-se que elas metabolizam os produtos imediatos da quebra da sacarose e amido via glicólise clássica de intermediários (PLAXTON, 1996). Em dezembro de 93 os teores de amido foram muito baixos e parece que houve ligeiro aumento com a cura, mas observando-se os desvios padrões não se pode considerar como

um aumento. Defende-se a teoria de que o amido é hidrolisado dentro do amiloplasto em trioses fosfatos, as quais difundem-se prontamente através do envelope do amiloplasto em direção ao citosol (ECHEVERRIA *et al.*, 1988). Dentro do citosol, como foi reportado por BEAUDRY *et al.* (1989), trioses ou hexoses fosfatos, predominantemente são utilizadas na síntese da sacarose e outros açúcares (gluconeogênese) ou na produção de CO₂ (glicólise).

Estatisticamente pode-se comprovar uma resposta ao curado nos níveis de sacarose dos frutos. A interação pré-tratamento (com e sem cura) e temperatura (2 e 12°C) apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) para a variável sacarose em 93/94 e 96/97. O teor de sacarose dos frutos armazenados a 2°C, principalmente nos que sofreram cura, permaneceu elevado por mais tempo. Por outro lado, o nível de sacarose dos frutos curados e armazenados a 12°C caiu rapidamente e se manteve mais baixo comparando-o com os outros tratamentos. Estas duas observações sugerem que o tratamento de cura pode ter estimulado a produção de sacarose, provavelmente, como consequência de um aumento de enzimas e/ou da atividade enzimática relacionada à síntese da sacarose. LURIE *et al.* (1995) reportaram que o estresse pelo calor induz a uma variedade de mudanças bioquímicas que podem ajudar um organismo a se adaptar ao estresse. A glicose e a frutose, substratos para a síntese da sacarose, de maneira geral, foram os que apresentaram maior queda nos frutos curados, principalmente nas tangerinas armazenadas a 2°C.

O estágio II de maturação em 1993/94, apresentou comportamento distinto dos estádios I e III, assim como dos três estádios de 96/97. Com exceção deste estágio em todos os outros as tangerinas 'Fortune' que sofreram o tratamento de cura mantiveram teor maior de sacarose durante o armazenamento a 2°C.

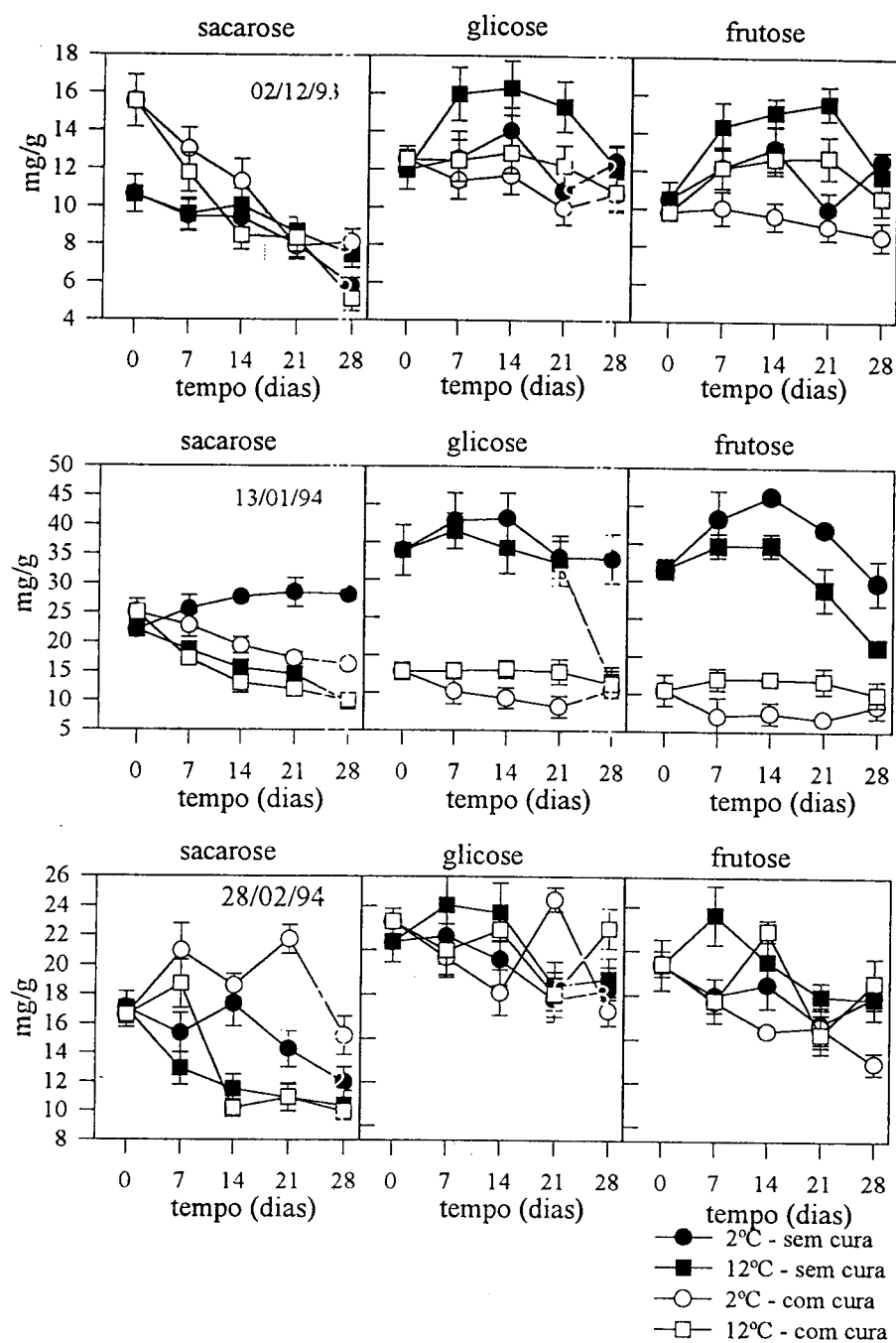


Figura 5: Sacarose, glicose e frutose (mg/g) do flavedo de tangerinas 'Fortune', em três estádios de maturação, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura em 1993/94.

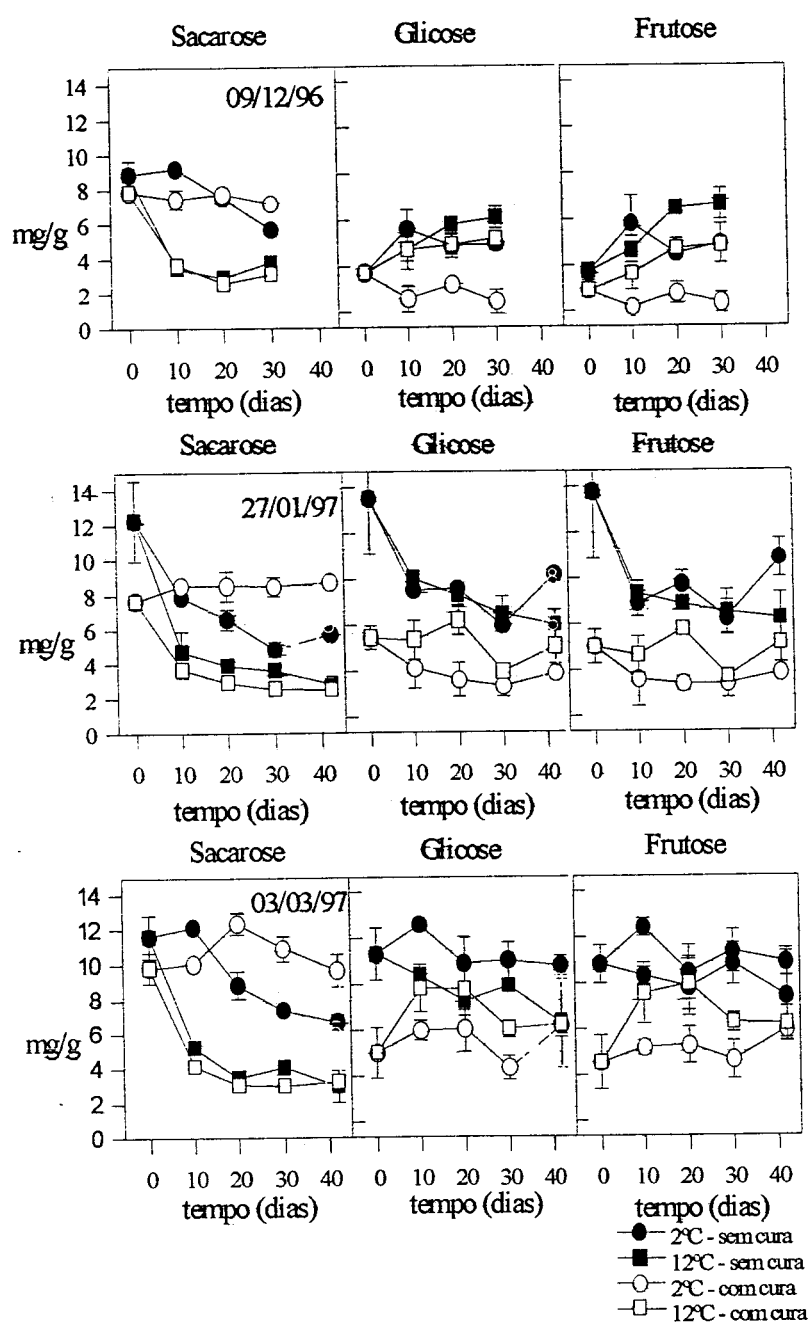


Figura 6: Sacarose, glicose e frutose (mg/g) do flavedo de tangerinas 'Fortune', em três estádios de maturação, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura em 1996/97.

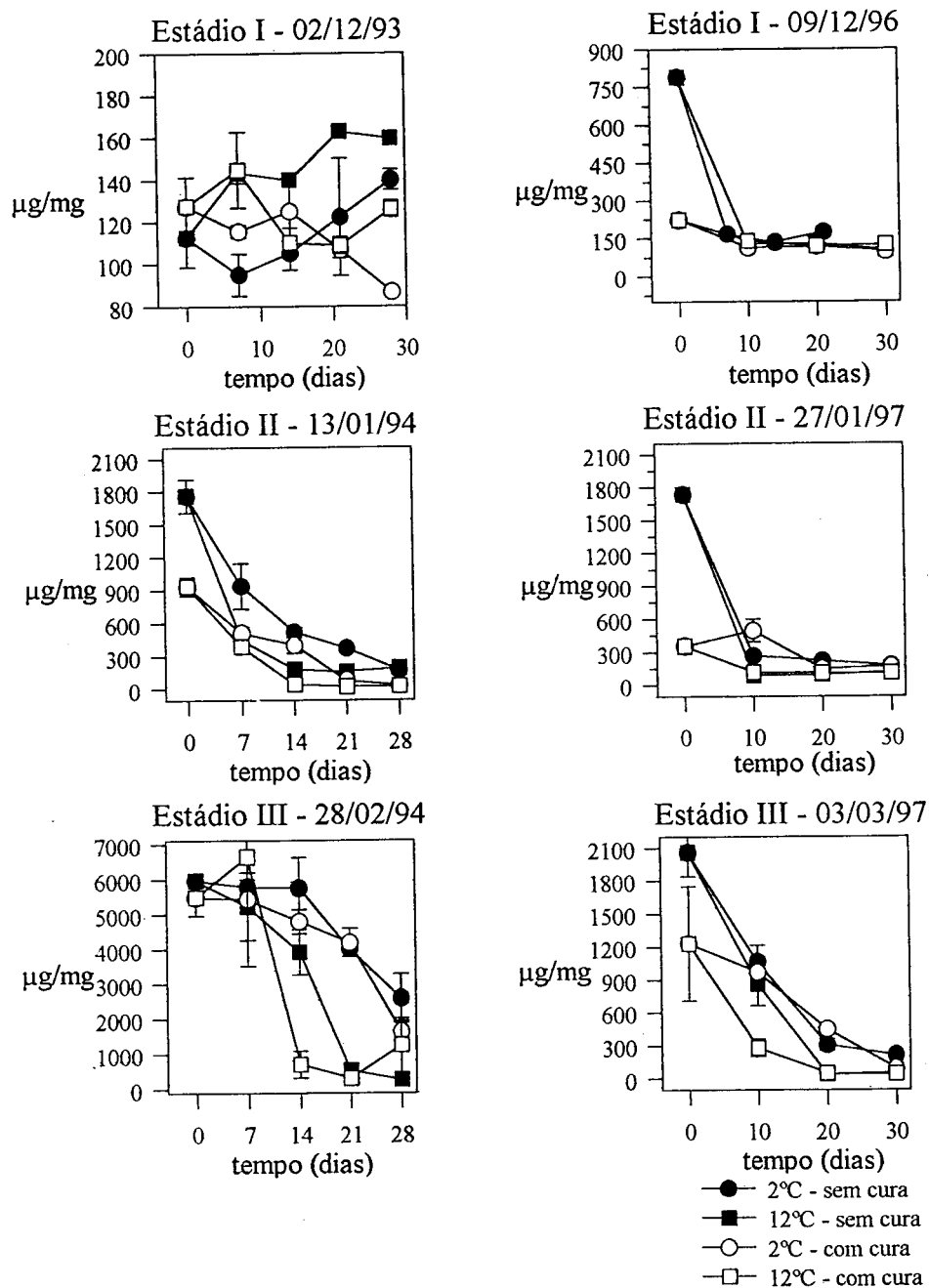


Figura 7: Amido ($\mu\text{g/g}$) do flavedo de tangerinas 'Fortune', em três estádios de maturação, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura nos anos de 1993/94 e 1996/97.

Tem-se proposto que com a aclimação ao frio ocorre aumento na capacidade fotossintetizante e alteração na regulação da atividade enzimática, maximizando a produção de açúcares com possível função crioprotetora. Isto foi verificado para espinafres (GUY *et al.*, 1992), centeio (HURRY *et al.*, 1994) e trigo (HURRY *et al.*, 1995). Para esta última cultura os autores reportaram que o trigo do inverno acumula suficiente armazenamento de reserva de carboidratos para suportar o metabolismo basal e um novo crescimento na primavera.

Em Sagunto, Valência - Espanha, onde se situa o pomar do qual os frutos foram colhidos, no mês de janeiro de 1994 o inverno foi mais rigoroso do que em janeiro de 1997 com temperaturas mínimas de 3,69 e 6,47°C, respectivamente. Provavelmente, o maior acúmulo de açúcares solúveis no estágio II de maturação de 93/94 se deva a essa temperatura mais baixa. Este fato permite concluir que com maior concentração de açúcares, inclusive de sacarose, o tratamento de cura associado ao estresse do armazenamento a 2°C não provocou as reações glicolíticas e de gluconeogênese referentes a sacarose como nos outros estádios de maturação estudados. Talvez devido a um controle equilibrado do fruto, interligado com a não necessidade de acionar uma resposta ao estresse pelo metabolismo dos carboidratos.

Em 96/97, com a cura houve uma correlação negativa significativa ($p < 0,05$) entre glicose e sacarose e frutose com sacarose para o estágio I de maturação com $r = -0,77$ e $-0,75$ e para o estágio III com $r = -0,44$ e $-0,58$, respectivamente. De acordo com LAFTA & LORENZEN (1995), em folhas maduras de batatas, temperaturas altas levou a diminuição em amido e aumento no nível de sacarose coincidindo com um aumento na atividade da SPS, mas não afetou a glicose. O teor de amido no presente trabalho, além da queda durante o processo de cura em comparação aos não curados, apresentou rápida e gradativa diminuição durante o armazenamento, principalmente dos frutos armazenados a 12°C (Figura 7).

A reserva de amido do flavedo das tangerinas 'Fortune', provavelmente foi continuamente utilizada, assim como os açúcares redutores, a fim de manter a síntese da sacarose de frutos curados e armazenados a 2°C. De acordo com KUZNETSOV & SHEVYAKOVA (1997), o amido dos plastídeos representa uma reserva de açúcares e é

rapidamente convertido a sacarose em condições de estresse. Porém, a degradação do amido parece estar mais relacionada com o fornecimento de substratos para a respiração, já que frutos armazenados a 12°C produziram mais CO₂, enquanto a diminuição dos açúcares redutores parece estar mais associada com a síntese de sacarose dos frutos curados e armazenados a 2°C.

PLAXTON (1996) reportou que tem sido um intrigante problema elucidar os respectivos papéis, regulação e importância relativa das várias reações alternativas da glicólise citosólica das plantas. Tem sido mostrado diferenças na maneira em que fluxos de hexoses são controlados nos tecidos fotossintetizantes e não fotossintetizantes. Suspensões de culturas de células não fotossintetizantes têm dois ciclos rápidos de substratos no citosol, um entre hexose-fosfatos e triose-fosfatos catalisados pela pirofosfato : fosfato-6-fosfato fosfotransferase (HATZFELD *et al.*, 1990), e outro no qual a sacarose é simultaneamente sintetizada e degradada (WENDLER *et al.*, 1991). De acordo com GEIGENBERGER & STITT (1991), estes ciclos de substratos permitem o “turnover” de sacarose para responder sensitivamente às mudanças no suprimento de carbono, e a demanda do carbono para o crescimento e respiração.

Como já foi descrito anteriormente as tangerinas ‘Fortune’, as quais foram submetidas ao tratamento de cura, não desenvolveram os sintomas de injúria pelo frio quando armazenadas a 2°C. O fato de que o processo de cura levou a maior estabilidade da sacarose durante o armazenamento a 2°C, parece indicar que a sacarose pode ter exercido um papel protetor ou de defesa frente ao mecanismo de injúria pelo frio.

A alta taxa de síntese de açúcar durante o resfriamento poderia ter vários efeitos benéficos para as plantas, sendo um deles o de maior potencial osmótico nas células (KELLER & STEFFEN, 1995). Os açúcares solúveis, tais como sacarose, glicose e frutose têm sido implicados em uma maior tolerância de tomates ao frio. KING *et al.* (1988) reportaram que altos níveis endógenos de sacarose, bem como aplicações exógenas resultaram em maior tolerância ao frio. O aumento dos níveis de açúcares à temperatura baixa, de acordo com PURVIS (1990), pode aumentar o turgor da célula e estabilizar membranas celulares e proteínas sob condições de baixa disponibilidade de água, o que em geral ocorre sob temperaturas baixas.

É também importante mencionar que segundo PLAXTON (1996), através da glicólise, além de se obter o “combustível” para a respiração, uma proporção significativa do carbono que entra nos modelos glicolíticos e do ácido tricarboxílico da planta não é oxidada a CO₂, mas é utilizada na biossíntese de numerosos compostos tais como metabólitos secundários, isoprenóides, aminoácidos, ácidos nucleicos e ácidos graxos. A presença de maior proporção de ácidos graxos insaturados comparada a de ácidos graxos saturados tem sido relacionada com a maior resistência ao frio em batatas (SPYCHALLA & DESBOROUGH, 1990), maçãs (LURIE *et al.*, 1995) e inclusive tangerinas ‘Fortune’ (MULAS *et al.*, 1996), entre outros.

Além dos açúcares solúveis, principalmente a sacarose, outros componentes têm sido associados ao mecanismo de defesa ao frio, tais como: as proteínas de choque ao calor - HSPs (SABEHAT *et al.*, 1996), a presença de antioxidantes (MARTÍNEZ-TÉLLEZ & LAFUENTE, 1997 e SALA, 1998), o acúmulo de ácido abscísico (JANOWIAK & DÖRFFLING, 1996), as mudanças em poliaminas (JOUVE *et al.*, 1995). Porém, as alterações destes compostos, assim como a relação destes com o mecanismo de defesa ao frio, varia entre as espécies e variedades. Além do que seria mais correto responsabilizar, à tolerância maior das plantas ao frio, à associação entre duas ou mais destas diferentes respostas mencionadas do que a uma resposta isolada provocada pelo pré- tratamento de calor.

3.3.6. Atividades das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS) e sacarose sintase (SS)

Com o tratamento de cura das tangerinas ‘Fortune’ a atividade específica da SPS V_{máx} de 93/94 (Figura 8) apresentou pequeno aumento, enquanto a SPS lim e a SS diminuíram. No ano de 96/97 (Figura 9), no estágio I de maturação houve um aumento nas atividades da SPS V_{máx}, SPS lim e SS, resultando em ligeira diminuição da sacarose. No estágio II de maturação a SPS V_{máx} e lim aumentaram e a SS diminuiu, enquanto o teor de sacarose apresentou uma queda com a cura. Por último, no estágio III, a SPS V_{máx} e a SS diminuíram e a SPS lim aumentou coincidindo com uma pequena diminuição da sacarose. Através destas observações, torna-se difícil uma relação direta entre as enzimas analisadas e as modificações no nível de sacarose com o tratamento de cura. Por

tratar-se de um comportamento pouco definido das enzimas durante os estádios de maturação, pode-se considerar que a diminuição pouco expressiva da sacarose tenha resultado: a) da variação da quantidade de cada enzima em cada estágio de maturação, assim como das suas respectivas atividades; b) do balanço entre as enzimas de síntese e de degradação da sacarose (HUBBARD *et al*, 1989). Torna-se importante lembrar que a SS possui propriedades bioquímicas as quais permitem que ela atue na direção de síntese e clivagem da sacarose, e que em um trabalho de PURVIS & RICE (1983), a enzima invertase, que atua na degradação da sacarose, foi identificada em flavedo de pomelos.

Nas atividades enzimáticas específicas determinadas para a 'Fortune' em 93/94, a SPS $V_{m\acute{a}x}$ aumenta durante os 7 dias de armazenamento a 2°C, exceto no estágio III. Parece haver relação entre essas mudanças e a sacarose, quando se observa os estádios de janeiro e fevereiro. As mudanças em amido, no geral, são contrárias as da SPS, podendo-se dizer que quando o nível de amido caiu, a SPS $V_{m\acute{a}x}$ aumentou. No estágio III de maturação não mudou o amido e nem a SPS. Acredita-se que a SPS tem um papel crítico na biossíntese da sacarose pelo ciclo de Calvin em cloroplastos e reações de "turnover" do amido no citosol, em ambientes fotossintetizantes e não fotossintetizantes, respectivamente (CHENG *et al.*, 1996).

Estatisticamente, houve efeito significativo ($p < 0,05$) na variável pré-tratamento (com e sem cura) para as enzimas SPS lim e SS, havendo na primeira aumento da atividade com o tratamento de cura e para a segunda diminuição da atividade. A variável temperatura (2 e 12°C) também apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) para as três atividades enzimáticas avaliadas. Em geral, verifica-se pela Figura 9 que a SPS $V_{m\acute{a}x}$, SPS lim e SS apresentaram comportamento parecido, ou seja, suas atividades foram maiores a 2°C do que a 12°C. Com este fato não se pode concluir se a SS apresentou um comportamento de síntese ou clivagem da sacarose ou ainda de ambos, além do que sugere a presença de efetiva atividade da enzima invertase, principalmente a 12°C, onde a queda do teor de sacarose é rápida e constante. A 12°C houve uma correlação significativa ($p < 0,05$) entre a baixa atividade da SPS $V_{m\acute{a}x}$ e o teor de sacarose de frutos curados nos estádios de maturação I, II e III com valores de $r = 0,62, 0,85$ e $0,81$, respectivamente.

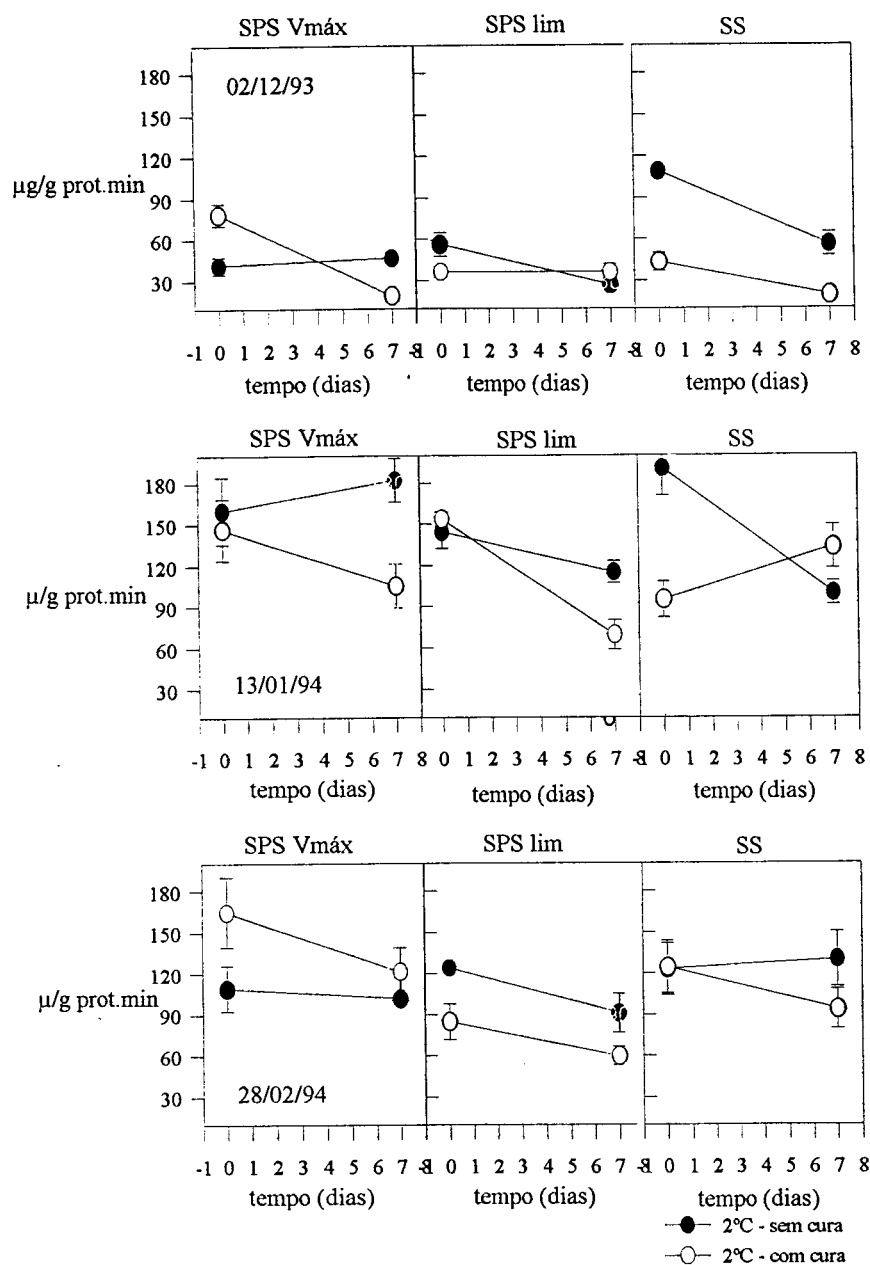


Figura 8: Atividades específicas ($\mu\text{g/g prot. min.}$) das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS Vmáx e SPS lim) e sacarose sintase (SS) do flavedo de tangerinas 'Fortune', em três estádios de maturação, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura em 1993/94.

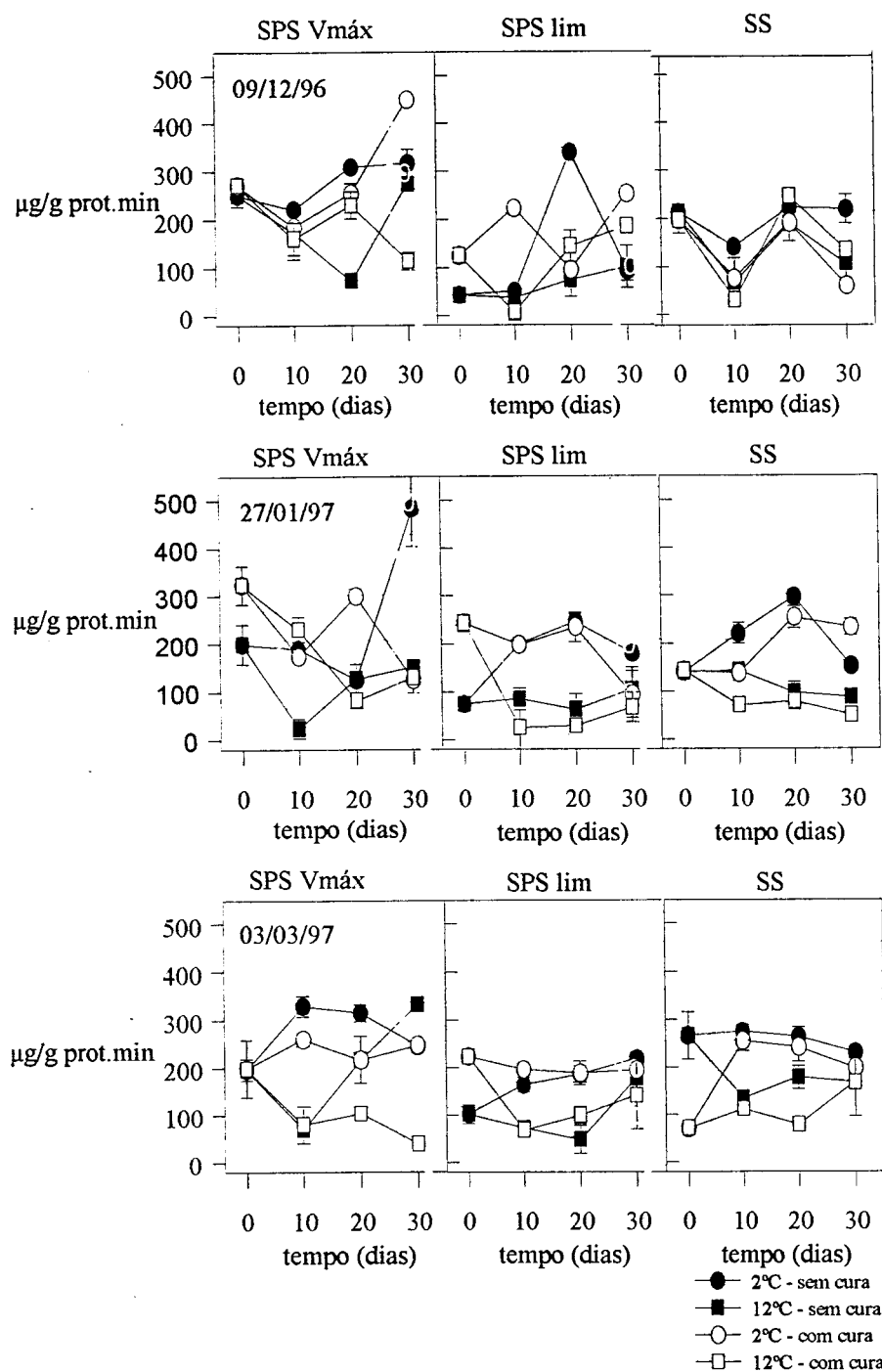


Figura 9: Atividades específicas (µg/g prot.min) das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS Vmáx e SPS lim) e sacarose sintase (SS) do flavedo de tangerinas 'Fortune', em três estádios de maturação, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura em 1993/94.

De maneira geral, em vários tempos de armazenamento a 2°C nos frutos curados as atividades da SPS V_{máx} e/ou da SPS lim mostraram-se superiores as da SS quando comparadas as atividades dos frutos sem cura, o que pode ser relacionado com a manutenção do maior nível de sacarose neste tratamento.

3.4. CONCLUSÕES

As injúrias por frio provocaram maior perda de massa, porém somente nos frutos dos estádios II e III.

Os frutos armazenados a 12°C produziram maior taxa de CO₂. Houve elevação de etileno de frutos não curados e armazenados a 2°C, porém não parece estar diretamente relacionada com os sintomas de injúria pelo frio.

O tratamento de cura impediu as injúrias no flavedo dos frutos provocadas pelo frio.

Os níveis de sacarose, glicose e frutose aumentaram do estágio I de maturação para o estágio II e diminuíram no estágio III, enquanto o amido apresentou um aumento crescente. Em frutos curados e armazenados a 2°C o teor da sacarose se manteve mais elevado e o da glicose e frutose mais baixo. Evidências sugerem que a sacarose, entre outros fatores, exerceu um papel de defesa frente ao mecanismo de injúria pelo frio.

De maneira geral, o comportamento da SPS V_{máx}, SPS lim e SS foi parecido, apresentando uma maior atividade enzimática a 2°C do que a 12°C. Este fato não possibilita concluir o tipo de atuação da SS (síntese, clivagem ou ambos).

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALIQUE, R.; ZAMORANO, J. P.; CALVO, M. L.; MERODIO, C.; DE LA PLAZA, J. L. Tolerance of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) to cold storage. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.119, n.3, p.524-528, 1994.
02. ATTA-ALY, M. Effect of high temperature on ethylene biosynthesis by tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.2, p.19-24, 1992.
03. BEAUDRY, R. M.; SEVERSON, R. F.; BLACK, C. C.; KAYS, S. J. Banana ripening: implications of changes in glycolytic intermediate concentrations glycolytic and gluconeogenic carbon flux, and fructose 2,6-bisphosphate concentration. **Plant Physiology**, v.91, p.1436-1444, 1989.

04. CHENG, W. H.; IM, K. H.; CHOUREY, P. S. Sucrose phosphate synthase expression at the cell and tissue level is coordinated with sucrose sink-to-source transitions in maize leaf. **Plant Physiology**, v.111, p.1021-1029, 1996.
05. CUQUERELLA, J.; MARTÍNEZ-JAVEGA, J. M.; MATEOS, M. Influencia de la temperatura y de las envolturas plásticas en la conservación de mandarinas 'Fortune'. **Acta de Horticultura**, v.2, p.410-416, 1990.
06. ECHEVERRIA, E.; BOYER, C. D.; THOMAS, P. A.; LIU, K-C, SHANNON, J. C. Enzyme activities associated with maize Kernel amyloplasts. **Plant Physiology**, v.86, p.786-792, 1988.
07. EL-OTMANI, M.; COGGINS, C. W., Jr. Fruit age and growth regulator effects on the quantity and structure of the epicuticular wax of 'Washington' Navel orange fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.110, n.3, p.371-378, 1985.
08. GEIGENBERGER, P.; STITT, M. A "futile" cycle of sucrose synthesis and degradation is involved in regulating partitioning between sucrose, starch and respiration in cotyledons of germinating *Ricinus communis* L. seedlings when phloem transport is inhibited. **Planta**, v.185, p.81-90, 1991.
09. GONZÁLEZ-AGUILAR. **Papel de las poliaminas y su relación com otros reguladores del desarrollo en la susceptibilidad al frío de tejidos vegetales.** Valencia, 1995. 121p. Tese (Doctor en Ingenieria Química) - Facultad de Farmacia, Universidad Politecnica de Valencia.
10. GUY, C. L.; HUBER, J. L. A; HUBER, S. C. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. **Plant Physiology**, v.100, p.502-508, 1992.
11. HATZFELD, W. D.; DANCER, J. E.; STITT, M. Fructose-2,6-bisphosphate metabolites and 'coarse' control of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase during triose-phosphate cycling in heterotrophic cell-suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. **Planta**, v.180, p.205-211, 1990.
12. HOUCK, L. G.; JENNER, J. F.; MACKEY, B. E. Seasonal variability of the response of desert lemons to rind injury and decay caused by quarantine cold treatments. **Journal Horticultural Science**, v.65, p.611-617, 1990.
13. HUBBARD, N. L.; HUBER, S. C.; PHARR, D. M. Sucrose phosphate synthase and acid invertase as determinants of sucrose concentration in developing muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruits. **Plant Physiology**, v.91, p.1527-1534, 1989.

14. HURRY, V. M.; MALMBERG, G.; GARDESTRÖM, P.; ÖQUIST, G. Effects of a short-term shift to low temperature and of long-term cold hardening on photosynthesis and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase and sucrose phosphate synthase activity in leaves of winter rye (*Secale cereale* L.). **Plant Physiology**, v.106, p.983-990, 1994.
15. HURRY, V. M.; STRAND, A.; TOBIAESON, M.; GARDESTRÖM, P.; ÖQUIST, G. Cold hardening of spring and winter wheat and rape results in differential effects on growth, carbon metabolism, and carbohydrate content. **Plant Physiology**, v.109, p.697-706, 1995.
16. JANOWIAK, F.; DÖRFFLING, K. Chilling of maize seedlings: changes in water status and abscisic acid content in ten genotypes differing in chilling tolerance. **Journal Plant Physiology**, v.147, p.582-588, 1996.
17. JOBLING, J.; McGLASSON, W. B.; DILLEY, D. R.; Introduction of ethylene synthesizing competency in Grammy Smith apples by exposure to low temperature in air. **Postharvest Biology and Technology**, v.1, p.111-118, 1991.
18. JOUVE, L.; FOUCHE, J. G.; GASPAR, T. Early biochemical changes during acclimation of poplar to low temperature. **Journal Plant Physiology**, v.147, p.247-250, 1995.
19. KELLER, E.; STEFFEN, K. L. Increased chilling tolerance and altered carbon metabolism in tomato leaves following application of mechanical stress. **Physiologia Plantarum**, v.93, p.519-525, 1995.
20. KING, A. I.; JOYCE, D. C.; REID, M. S. Role of carbohydrates in diurnal chilling sensitivity of tomato seedlings. **Plant Physiology**, v.86, p.764-768, 1988.
21. KUZNETSOV, V. V.; RAKITIN, V. Y.; BORISOVA, N. N.; ROTSCHUPKIN, B. V. Why does heat shock increase salt resistance in cotton plants? **Plant Physiology Biochemistry**, v.31, n.2, p.181-188, 1993.
22. KUZNETSOV, V. V.; SHEVYAKOVA, N. I. Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.320-326, 1997.
23. LAFTA, A. M.; LORENZEN, J. H. Effect of high temperature on plant growth and carbohydrate metabolism in potato. **Plant Physiology**, v.109, p.637-643, 1995.
24. LAFUENTE, M. T.; BELVER, A.; GUYE, M. G.; SALTVEIT, Jr. M. E. Effect of temperature conditioning on chilling injury of cucumber cotyledons. Possible role of abscisic acid and heat shock proteins. **Plant Physiology**, v.95, p.443-449, 1991.

25. LAFUENTE, M. T.; MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. A; ZACARÍAS, L. Absciscic acid in the response of 'Fortune' mandarins to chilling. Effect of maturity and high-temperature conditioning. **Journal Science of Food Agricultural**, v.73, p.494-502, 1997.
26. LEDERMAN, I. E.; ZAUBERMAN, G.; WEKSLER, A; ROT, I.; FUCHS, Y. Ethylene-forming capacity during cold storage and chilling injury development in 'Keitt' mango fruit. **Postharvest Biology and Technolog**, v.10, p.107-112, 1997.
27. LELIÈVRE, J-M.; TICHIT, L.; FILLION, L.; LARRIGAUDIÈRE, C.; VENDRELL, M; PECH, J-C. Cold-induced accumulation of 1-aminocyclopropane 1-carboxylate oxidase protein in Granny Smith apples. **Postharvest Biology and Technology**, v.5, p.11-17, 1995.
28. LURIE, S.; HANDROS, A; FALLIK, E.; SHAPIRA, R. Reversible inhibition of tomato fruit gene expression at high temperature. **Plant Physiology**, v.110, p.1207-1214, 1996.
29. LURIE, S.; KLEIN, J. D. Heat treatment of ripening apples: differential effects on physiology and biochemistry. **Physiologia Plantarum**, v.78, p.181-186, 1990.
30. LURIE, S.; KLEIN, J. D. Acquisition of low temperature tolerance in tomatoes by exposure to high temperature stress. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.116, p.1007-1012, 1991.
31. LURIE, S.; OTHMAN, S.; BOROCHOV, A Effects of heat treatment on plasma membrane of apple fruit. **Postharvest Biology and Technolog**, v.5, p.29-38, 1995.
32. LURIE, S.; SABEHAT, A Prestorage temperature manipulations to reduce chilling injury in tomatoes. **Postharvest Biology and Technology**, v.11, p.57-62, 1997.
33. MARTÍNEZ-JÁVEGA, J. M.; CUQUERELLA, J.; DEL RÍO, M. A; NAVARRO, P. High temperature conditioning of Fortune mandarins to reduce chilling injury during low temperature storage. **Proceedings Contribution du Froid a la Preservation de la Qualite des Fruits, Legumes et Produits Halieutiques**. Chapitre 8, p.87-92. Institu International du Froid. Actes du Symposium. Edite par A Lahman Bennami & and P. Messaho, 1994.
34. MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. A; LAFUENTE, M. T. Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase activities in flavedo of chilled 'Fortune' mandarin fruit. **Journal Plant Physiology**, v.150, p.674-678, 1997.

35. McCOLLUM, T. G.; McDONALD, R. E. Electrolyte leakage, respiration, and ethylene production as indices of chilling injury in grapefruit. **HortScience**, v.26, n.9, p.1191-1192, 1992.
36. MULAS, M.; LAFUENTE, M. T.; ZACARÍAS, L. Chilling effects on fatty acid composition of flavedo lipids in stored 'Fortune' mandarins. **Advances in Horticultural Science**, v.10, p.85-90, 1996.
37. NORBY, H. E.; McDONALD, R. E. Variations in chilling injury and epicuticular wax composition of white grapefruit with canopy position and fruit development during season. **Journal Science of Food Chemistry**, v.43, p.1828-1833, 1995.
38. PLAXTON, W. C. The organization and regulation of plant glycolysis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p.185-214, 1996.
39. PURVIS, A C. Importance water loss in the chilling injury of grapefruit stored at low temperature. **Science Horticultural**, v.23, p.261-267, 1984.
40. PURVIS, A C. Relation of chilling stress to carbohydrate composition. In: Wang, C. Y. **Chilling Injury of Horticultural Crops**. Boca Ranton: CRC Press, 1990. p.211-221.
41. PURVIS, A C.; RICE, J. D. Low temperature induction of invertase activity in grapefruit flavedo tissue. **Phytochemistry**, v.22, n.4, p.831-834, 1983.
42. SABEHAT, A; WEISS, D.; LURIE, S. The correlation between heat-shock protein and accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruit. **Plant Physiology**, v.110, p.531-537, 1996.
43. SALERNO, G. L.; PONTIS, H. G. Raffinose synthesis in *Chlorella vulgaris* cultures after a cold shock. **Plant Physiology**, v.89, p.648-651, 1989.
44. SÁNCHEZ-BALLESTA, M. T. **Caracterización molecular de los daños por frío en frutos de mandarina 'Fortune'**. Valencia, 1998. 126p. Tesis Doctoral, Universidad Politecnica de Valencia.
45. SCHIRRA, M.; D'HALLEWIN, G. Storage performance of Fortune mandarins following hot water dips. **Postharvest Biology and Technology**, v.10, p.229-238, 1997.
46. SPYCHALLA, J. P.; DESBOROUGH, S. L. Fatty acids, membrane permeability, and sugars of stored potato tubers. **Plant Physiology**, v.94, p.1207-1213, 1990.

47. TREVIÑO, J.; CENTENO, C.; ORTIZ, L. T.; CABALLERO, R. Changes in the non-structural carbohydrates associated with the field drying of oat forage. **Journal of the Science and Food Agricultural**, v.67, p.393-397, 1995.
48. TUCKER, G. A; GRIERSON, D. Fruit ripening. IN: **The biochemistry of plants - A comprehensive treatise**. (ed. D.D. Davies), London: Academic Press, 1987. v12, p.265-318.
49. UNDERHILL, S. J.; McLAUCHLAN, R. L.; EAKS, I. 'Eureka' lemon chilling injury. **HortScience**, v.30, n.2, p.309-312, 1995.
50. VERCHER, R.; TADEO, F. R.; ALMELA, V.; ZARAGOZA, S.; PRIMO-MILLO, E.; AGUSTÍ, M. Rind structure, epicuticular wax morphology and water permeability of 'Fortune' mandarin fruits affected by peel pitting. **Annals of Botany**, v.74, p.619-625, 1994.
51. WANG, C. Y. Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress. **HortScience**, v.17, n.2, p.173-186, 1982.
52. WENDLER, R.; VEITH, R.; DANCER, J.; STITT, M.; KROMOR, E. Sucrose storage in cell suspension cultures of *Saccharum* (Sugar cane) is regulated by a cycle of synthesis and degradation. **Planta**, v.183, p.31-39, 1991.
53. YANCEY, P. H.; CLARK, M. E.; HAND, S. C.; BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, v.217, p.1214-1222, 1982.

CAPÍTULO 4

EFEITO DO TRATAMENTO DE CURA NAS MODIFICAÇÕES DO TEOR DE CARBOIDRATOS DE LARANJAS RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS AO FRIO DURANTE O ARMAZENAMENTO À BAIXA TEMPERATURA

EFEITO DO TRATAMENTO DE CURA NAS MODIFICAÇÕES DO TEOR DE CARBOIDRATOS DE LARANJAS RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS AO FRIO DURANTE O ARMAZENAMENTO À BAIXA TEMPERATURA

RESUMO

As laranjas da variedade 'Navelate' e seu mutante 'Pinalate', susceptíveis e resistentes ao frio, respectivamente, foram colhidas a dois estádios de maturidade (21/03/96 e 22/04/96). Metade dos frutos foi submetida a um processo de acondicionamento a alta temperatura (cura) e todos os frutos foram armazenados a 2°C (temperatura que pode provocar danos no flavedo) e 12°C (temperatura controle). Teve-se como objetivos avaliar o efeito do acondicionamento nas duas variedades das laranjas e comparar as modificações nos carboidratos, a fim de auxiliar em uma maior compreensão do papel dos açúcares na aclimação dos frutos cítricos ao estresse pelo frio. O tratamento de cura foi eficiente na redução de danos causados pelo frio em laranjas 'Navelate'. Os frutos mais maduros desta cultivar foram mais sensíveis ao armazenamento a 2°C. Os frutos 'Pinalate' armazenados a 12°C apresentaram o maior índice de danos, os quais não são injúrias provocadas pelo frio. Em geral, os frutos 'Pinalate' apresentaram um maior teor de sacarose, glicose, frutose e amido. O nível de sacarose aumentou nas duas variedades após o acondicionamento dos frutos por 3 dias a 37°C. Tal aumento foi maior nos frutos mais maduros. O nível de sacarose dos frutos curados e armazenados a 2°C manteve-se superior aos dos frutos expostos aos outros tratamentos. Com a cura e durante o armazenamento a 2°C os açúcares redutores e o amido diminuíram ao mesmo tempo que aumentou o teor de sacarose. A cultivar Pinalate apresentou uma maior atividade das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS) e sacarose sintase (SS), o que pode ser relacionado com o seu maior teor de carboidratos. Em geral, houve um aumento da atividade da SPS $V_{m\acute{a}x}$ e da SS com a cura, o que foi paralelo ao aumento em sacarose. A cura pode aumentar o teor de sacarose no flavedo da variedade de frutos cítricos susceptível ao frio, e também da variedade tolerante. O aumento induzido por alta temperatura pode ser superior ao induzido pelo frio durante tempos maiores de exposição. Os resultados gerais indicam que as mudanças metabólicas que ocorreram durante o

armazenamento não estão diretamente relacionadas às diferenças na resposta das duas variedades frente ao estresse ao frio, contudo, o aumento em sacarose pode ser um dos mecanismos implicados na aclimação de frutos cítricos ao frio.

EFFECT OF HIGH TEMPERATURE CONDITIONING ON THE CHANGES IN THE CARBOHYDRATE CONTENTS OF COLD-RESISTANT AND COLD-SENSITIVE ORANGES DURING LOW TEMPERATURE STORAGE

SUMMARY

Oranges of the cultivar 'Navelate' and its mutant 'Pinalate', respectively susceptible and resistant to chilling, were harvested at two maturity stages (03/21/96 and 04/22/96). Half the fruits were submitted to the process of high temperature conditioning (curing) and all were stored at both 2°C (temperature which may cause chilling damage to the flavedo) and 12°C (nonchilling temperature). The objectives were to evaluate the effect of conditioning on both oranges varieties and on the changes in the carbohydrates, in order to better understand the role of the sugars in the acclimation of citrus fruits to chilling stress. Curing was efficient in reducing the damage caused by cold in the 'Navelate' oranges. The more mature fruits harvest were more sensitive to chilling. The 'Pinalate' oranges stored at 12°C showed the highest indexes of damage, whereas at 2°C did not show peel damage. In general, the 'Pinalate' fruits showed higher sucrose, glucose, fructose and starch contents. The level of sucrose increased in both varieties after conditioning the fruits for 3 days at 37°C. Such increase was higher in the more mature fruits. The levels of sucrose in conditioned fruits stored at 2°C remained higher than in fruits exposed to the other treatments. Curing plus storage at 2°C resulted in a decline in reducing sugars and starch and an increase in sucrose contents. The cultivar 'Pinalate' presented greater activity of the enzymes sucrose phosphate synthase (SPS) and sucrose synthase (SS), which might be related to its higher carbohydrate content. In general, there was an increase in the activities of SPS Vmax and SS with conditioning, which paralleled the increase in sucrose. Curing may increase the sucrose contents in the flavedo of the chilling sensitive citrus variety but also in the tolerant one.. The high temperature-induced increase may be greater than the induced by long periods of exposure to the cold. In general, the results indicated that metabolic changes occurring during storage were not directly related to the differences in the response of both varieties to cold stress. However, the increase in sucrose may be one of the mechanisms involved in the acclimation of citrus to chilling.

4.1. INTRODUÇÃO

A laranja 'Navelate', uma mutação da 'Washington Navel' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), possui alto teor de suco, com características doce e pouco ácido, o que são vantagens para a sua comercialização (PRIMO YÚFERA *et al.*, 1962), além da sua aparência atrativa de fruto grande com flavedo de coloração alaranjado forte. Já a 'Pinalate', apesar de ser um mutante espontâneo da laranja 'Navelate', trata-se de frutos menores e com coloração amarelo-clara. Isto porque, de acordo com ZACARIAS *et al.* (1997) na maturação dos frutos 'Navelate' ocorre uma transformação dos pigmentos até a síntese de xantofilas, que passam a ser 80% do total de pigmentos, enquanto os carotenóides se reduzem a 20%. Nos frutos 'Pinalate', entretanto, esta transformação não ocorre e os níveis de carotenóides continuam superiores a 90%. Porém, a 'Pinalate' é reconhecidamente resistente ao frio, ao contrário da outra cultivar que é susceptível. Ambas são variedades tardias do grupo Navel resultando em uma maior demanda pelo mercado em relação as laranjas 'Navelate', porém quanto ao mutante, este não se comercializa. A resistência ao frio das laranjas 'Pinalate' permite o seu prolongado armazenamento sob temperatura de refrigeração, o que faz esta cultivar ser especialmente interessante para se estudar os mecanismos relacionados com a tolerância ao estresse.

Não se tem conhecimento dos fatores que estariam relacionados à maior resistência ao frio das laranjas 'Pinalate'. Sabe-se que o acúmulo de compostos hidroxil, tais como sacarose, polióis, mono e oligossacarídeos tem sido verificado como uma importante resposta de proteção a estresses ambientais. KING *et al.* (1988) mostraram que altos níveis endógenos de sacarose bem como aplicações exógenas resultaram em um aumento da tolerância ao frio de plantas de tomate; sob o estresse de água (seca), YAKUSHIJI *et al.* (1996) observaram um aumento nas concentrações de sacarose, frutose e glicose em tangerinas Satsuma; com o estresse pelo calor houve o acúmulo de sacarose nas folhas maduras de batatas (LAFTA & LORENZEN, 1995); em condições de salinidade foi identificado um aumento de hexoses, sacarose e amido no pericarpo de tomates durante o período de crescimento (BALIBREA *et al.*, 1996).

As características especiais da cultivar Pinalate têm estimulado fortemente o seu estudo. Em específico para este trabalho, tem-se o objetivo de avaliar as modificações dos

carboidratos desta cultivar tolerante ao frio em resposta a diferentes condições de estresse comparando-as com as da 'Navelate', susceptível ao frio. Este estudo poderia auxiliar a maior compreensão do papel fisiológico dos açúcares na susceptibilidade ao frio de ambas as variedades e talvez até dos frutos cítricos em geral.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Material vegetal

Foram utilizadas laranjas 'Navelate', variedade sensível ao frio, e 'Pinalate' que é resistente ao frio. Os frutos foram coletadas em Múrcia, Valência - Espanha, em 21/03/96 e 22/04/96. Após o transporte de cerca de 1000 laranjas ao IATA (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos), estas foram selecionadas eliminando-se as que apresentavam injúrias e homogeneizadas quanto ao tamanho. Parte destes frutos sofreu um tratamento de cura em câmaras a 37°C e 90-95% de umidade relativa (U.R.), por 3 dias antes de serem armazenados a 2 e 12°C também com 90-95% U.R. Após 0, 7, 14, 30, 45 e 88 dias foi retirado o flavedo das laranjas de 3 repetições com 10 frutos para cada tratamento de temperatura, e este foi picado, homogeneizado, embalado em plásticos de PVC, congelado em nitrogênio líquido e acondicionado em câmara fria a -80°C.

Em cada tratamento (ausência ou presença de cura seguido de um armazenamento a 2 e 12°C), foram separados ao acaso, 30 frutos para a análise visual do índice de danos provocados pelo frio. Esta análise foi realizada semanalmente até o 75º dia de armazenamento.

4.2.2. Delineamento experimental e análises estatísticas

Trata-se de um experimento fatorial completo 2 x 2 x 2 x 6, utilizando-se blocos casualizados e considerando-se blocos os dois estádios de maturação. Os fatores avaliados foram: variedade ('Navelate' e 'Pinalate'), pré-tratamento (com e sem cura), temperatura (2 e 12°C) e tempos de armazenamento (0, 7, 14, 30, 45 e 88)

Os efeitos principais e os efeitos de interação dos tratamentos foram avaliados através de uma análise da variância (ANOVA) dos resultados experimentais.

Na avaliação de possíveis relações causa-efeito entre os diversos parâmetros estudados foi feita a análise de correlação.

Para a análise dos dados foi utilizado o programa “Statistica versão 5.0”.

4.2.3. Métodos

A avaliação do índice de danos pelo frio a 2°C e de danos causados no flavedo a 12°C foi realizada conforme descrita no capítulo 2. As extrações e determinações de carboidratos do flavedo (sacarose, glicose, frutose e amido), assim como das atividades enzimáticas (SPS e SS) e de proteínas totais também foram realizadas conforme descritas no capítulo 2.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Injúria pelo frio

As laranjas ‘Navelate’ da 1ª colheita (21/03/96), como se pode observar pela Figura 1, foram menos susceptíveis aos danos provocados pelo frio, quando armazenadas a 2°C, comparadas às da 2ª colheita (22/04/96). Neste caso parece haver uma relação estreita da susceptibilidade ao frio com a idade do flavedo ou estágio de maturidade fisiológica (ZARAGOZA *et al.*, 1996), do que com as condições climáticas (ALMELA *et al.*, 1992), já que não houve grande variação no clima entre os meses de março e abril.

Houve efeito significativo ($p < 0,05$) para a variável pré-tratamento (com e sem cura), assim como para a interação variedade x pré-tratamento. Através da Figura 1, verifica-se que as laranjas ‘Navelate’ submetidas ao tratamento de cura e armazenadas a 2°C foram mais resistentes aos danos por frio do que aquelas que não sofreram cura. Com relação as laranjas ‘Pinalate’, estas apresentaram um menor índice de danos no flavedo mesmo quando não foram curadas, uma vez que é uma cultivar reconhecidamente tolerante às injúrias pelo frio. Entretanto, quando armazenados a 12°C os frutos ‘Pinalate’, com e sem cura, apresentaram um maior índice de danos, mas são danos conhecidos como “ratat”, os que tiveram início no campo devido a desidratação provocada pela baixa umidade e temperatura e aos ventos fortes e frios (ALMELA *et al.* 1992), sendo que estes danos foram intensificados e até iniciados a 12°C. As injúrias conhecidas como “ratat”,

assim como as injúrias causadas pelo frio, tratam-se de depressões no flavedo, mas diferenciam-se por serem áreas que não escurecem.

ZACARIAS *et al.* (1997) reportaram que nas laranjas 'Pinalate', o bloqueio na síntese de carotenóides impede a formação do ácido abscísico (ABA), o qual regula o fechamento estomático. Desse modo, os frutos não regulam adequadamente a perda de água, já que possivelmente os estômatos estejam permanentemente abertos. Com os estômatos abertos, uma maior respiração dos frutos armazenados a 12°C, comparada com a de frutos armazenados a 2°C, resulta em uma maior transpiração ou seja, perda de água. Apesar de ainda não se ter nenhum estudo da variação na composição qualitativa e quantitativa da cera epicuticular, associada com a maturação e senescência, das laranjas 'Pinalate' e 'Navelate', também poderia ser este um outro fator a ser considerado para uma maior perda de massa e conseqüentemente um maior índice de danos no flavedo dos frutos do mutante.

EL-OTMANI & COGGINS (1985) reportaram que as cutículas das plantas e as ceras das superfícies são muito importantes para regular a perda de água, absorção e perda de compostos químicos, e elas freqüentemente possuem um papel na redução da invasão fúngica, abrasão mecânica e na resistência a poluentes e ao congelamento. De acordo com os autores citados anteriormente, nos frutos cítricos o conteúdo de ceras pode aumentar com a maturação. Este fato poderia justificar que as laranjas 'Pinalate', deficientes em ABA, pertencentes a 1ª colheita sofrem mais danos no flavedo a 12°C, já que os danos nesta temperatura parecem estar relacionados com a desidratação dos frutos.

Pode-se notar que há diferença entre os fatores que provocam as injúrias pelo frio a 2°C e uma maior desidratação a 12°C, uma vez que as laranjas 'Navelate' tiveram um índice de danos mais elevado na 2ª colheita a 2°C, enquanto que o mutante 'Pinalate' foi na 1ª colheita e a 12°C. PETRACEK *et al.* (1995), avaliaram as depressões no flavedo de pomelos 'Marsh' que se assemelham à injúria pelo frio. Verificaram que trata-se de uma desordem morfolologicamente similar à injúria pelo frio, porém desenvolvida em frutos encerados mantidos a 21°C e após 10 dias de armazenamento, ao contrário das depressões causadas pelo frio em frutos não encerados, mantidos a 4,5°C e após algumas semanas.

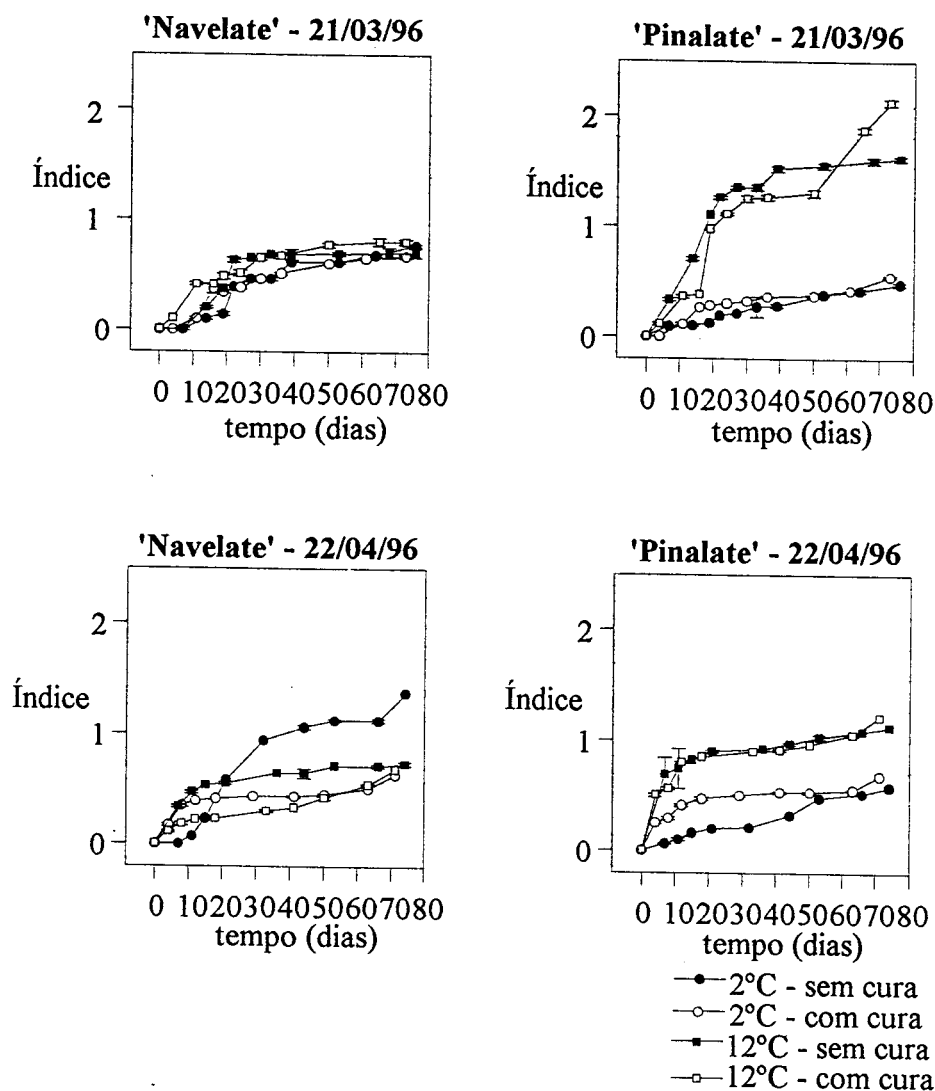


Figura 1: Índice de danos por frio de duas colheitas de laranjas 'Navelate' e 'Pinalate' durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura.

A variável tempo de armazenamento apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) pelo teste F. As injúrias no flavedo aumentaram com o tempo de armazenamento.

4.3.2. Modificações no conteúdo de carboidratos (sacarose, glicose, frutose e amido) do flavedo

Comparando-se o “ponto zero” (análise realizada logo após a coleta dos frutos) da 1ª e 2ª colheita dos cultivares Navelate e Pinalate, respectivamente, observa-se que a sacarose se manteve praticamente constante, com valores médios de 4,01 e 3,55; 7,03 e

7,33 mg/g de flavedo; enquanto o nível dos açúcares redutores apresentou pequena redução, com valores médios de 23,37 e 21,24; 24,82 e 20,74 mg/g de flavedo para a glicose e 21,99 e 19,41; 24,23 e 18,14 mg/g de flavedo para a frutose. O teor dos três açúcares foi maior para a laranja 'Pinalate', com exceção dos açúcares redutores na 2ª colheita, onde estes mostraram uma ligeira queda (Figuras 2, 3 e 4). TADEO *et al.* (1987) reportaram para as laranjas 'Navelate' valores de cerca de 4,0, 15,5 e 14,0 g/100 g para a sacarose, glicose e frutose, respectivamente, porém as determinações foram realizadas no exocarpo (flavedo e albedo) e não somente no flavedo dos frutos.

A quantidade de amido na 1ª colheita foi maior do que na 2ª colheita ($p < 0,05$), sendo que a variedade 'Pinalate' apresentou mais que o dobro de amido da variedade 'Navelate' ($p < 0,05$). Houve considerável redução do nível de amido de uma colheita para a outra em ambas as variedades. A interconversão do amido em açúcares e CO_2 está relacionada com o amadurecimento do fruto (McCREADY, 1977). Durante esta fase, a síntese ou degradação de vários outros constituintes celulares, como por exemplo, ácidos orgânicos, voláteis aromáticos, lipídeos, proteínas, celulose, lignina e pectina, representa um investimento mínimo de carboidratos (PALMER, 1971 *apud* BEAUDRY *et al.* 1989).

Houve efeito significativo ($p < 0,05$) pelo teste F para a variável pré-tratamento (com e sem cura) e para as interações de colheita x pré-tratamento e variedade x pré-tratamento em relação ao parâmetro sacarose. Em geral, o processo de cura aumentou os níveis de sacarose. Nos frutos colhidos em março (1ª colheita), o aumento foi muito pequeno na 'Navelate' variando de 4,01 a 5,64 e não variou na 'Pinalate,' com valores de 7,03 a 7,45 mg/g de flavedo, entretanto para os frutos colhidos em abril, a cura duplicou o teor de sacarose, elevando-se de 3,55 para 7,25 e de 7,33 para 14,19 mg/g de flavedo, respectivamente. Pode-se observar que o teor de sacarose das laranjas 'Navelate' foi a metade das 'Pinalate'. BOHNERT *et al.* (1995) reportaram que todas as plantas são capazes de perceber, avisar e responder a diferentes tipos de estresses. O maior aumento de sacarose na 2ª colheita provocado pelo tratamento de cura pode ter sido devido as condições fisiológicas dos frutos, proporcionadas pela maturidade mais avançada, ou então devido a necessidade de uma resposta mais forte de proteção ao flavedo.

Os açúcares são osmólitos onipresentes capazes de proteger as plantas contra vários tipos de estresses (RAIKHEL & LAST, 1993). O estresse pelo calor (37°C / 3 dias) levou ao aumento do teor de sacarose, o qual pode ter ocorrido como uma resposta direta a alta temperatura, ou indireta devido a uma conseqüente elevação da respiração resultando em maior perda de água, um outro tipo de estresse que foi estudado por YAKUSHIJI *et al.* (1996) em tangerinas 'Satsuma' e onde também foi verificado o aumento de açúcares. Segundo estes autores o acúmulo de açúcares nos frutos não foi causado pela desidratação, mas pela ativa osmorregulação em resposta ao estresse por falta de água. De acordo com MEYER & BOYER (1981), a osmorregulação envolve um suficiente acúmulo de solutos nas células para diminuir o potencial osmótico destas quando o potencial de água diminui devido ao baixo potencial da fonte de água, tanto que a água pode ser absorvida da fonte de água pelas células sem que estas percam o turgor ou diminuam em volume.

O tratamento de cura deve ter estimulado a atividade de enzimas que atuam no metabolismo dos açúcares, principalmente enzimas relacionadas com a síntese da sacarose. Sua síntese é catalisada pela sacarose fosfato sintase (SPS) e sacarose-6-fosfato (suc-6-P) e sua degradação é catalisada pela sacarose sintase (SS) ou invertase (PREISS, 1982). Apesar da sacarose sintase catalisar a interconversão reversível de sacarose e UDP para UDP-glicose e frutose, em vários trabalhos ela tem sido relacionada com a degradação da sacarose.

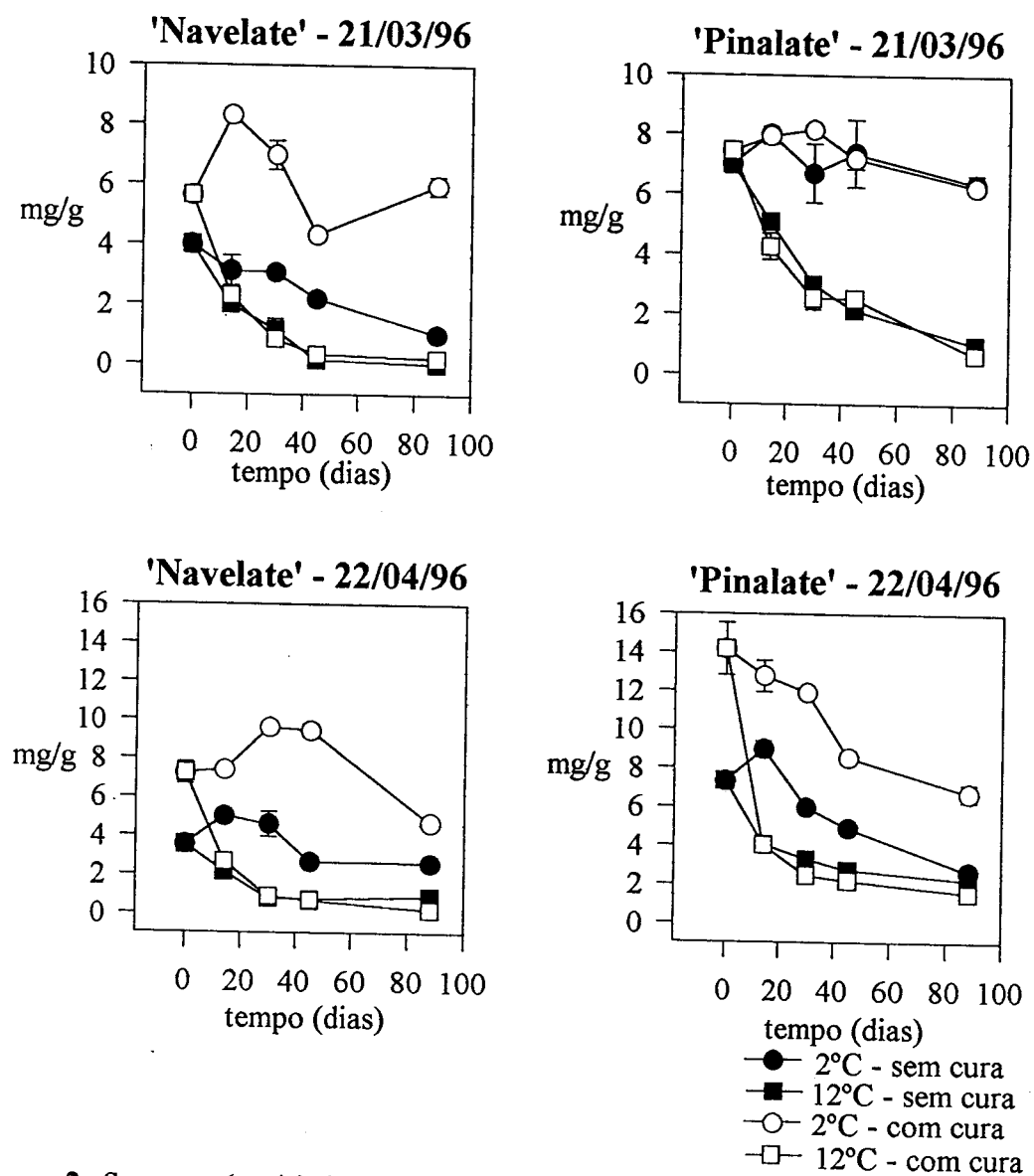


Figura 2: Sacarose (mg/g) do flavedo de laranjas 'Navelate' e 'Pinalate', de duas colheitas, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura.

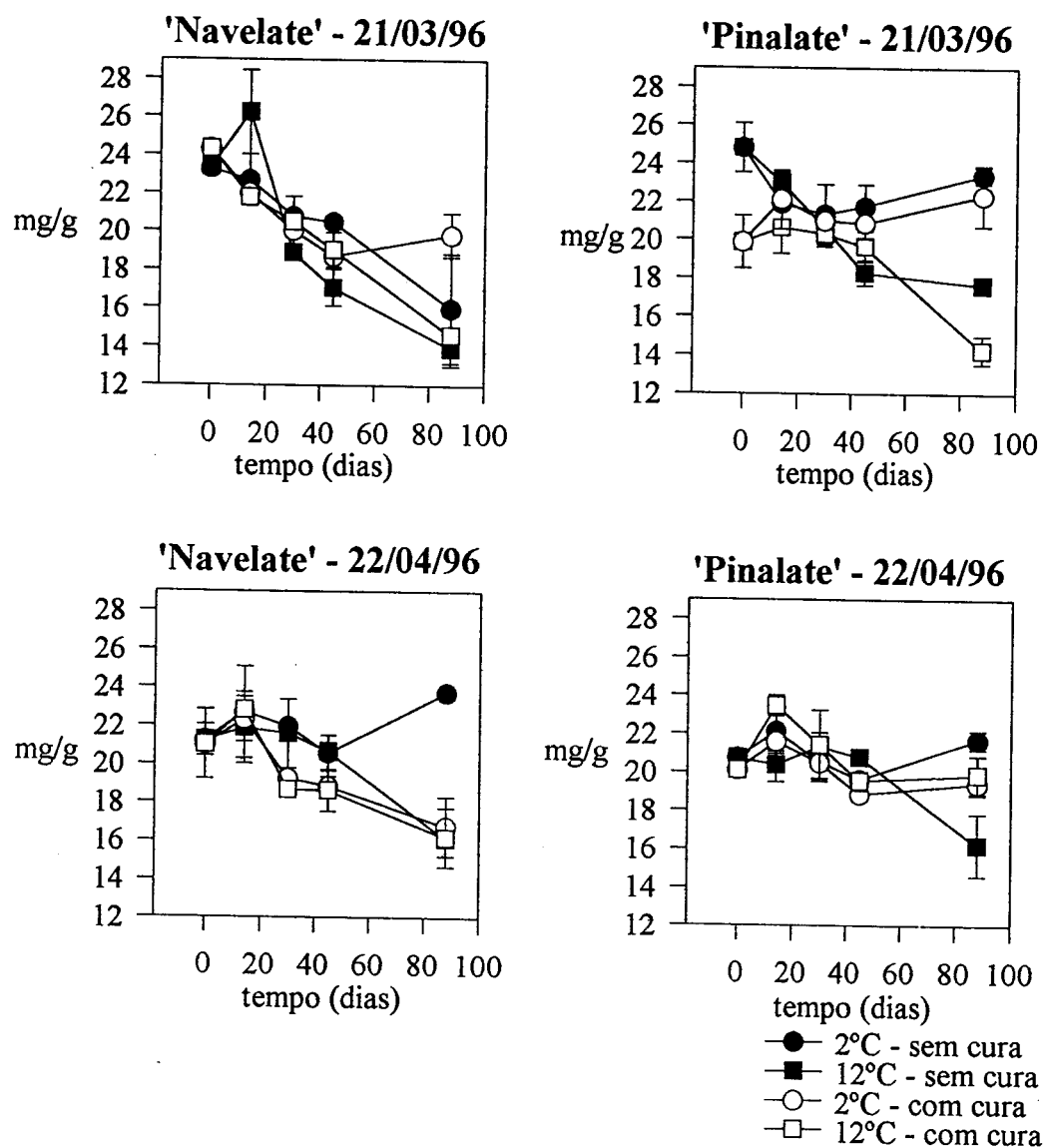


Figura 3: Glicose (mg/g) do flavedo de laranjas 'Navelate' e 'Pinalate', de duas colheitas, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura.

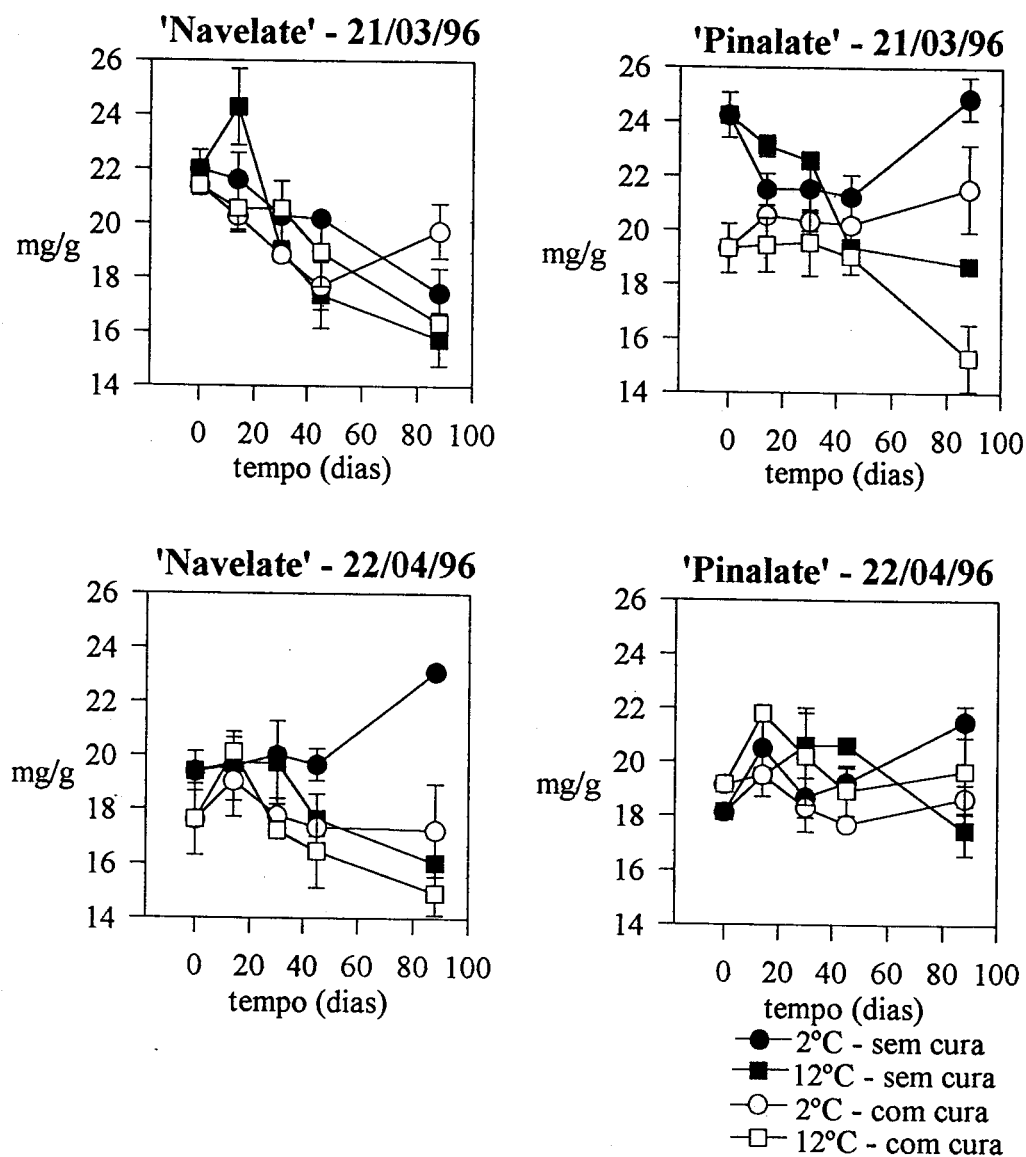


Figura 4: Frutose (mg/g) do flavedo de laranjas 'Navelate' e 'Pinalate', de duas colheitas, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura.

O balanço entre enzimas de síntese e degradação para os frutos curados e armazenados a 2°C, foi de tal forma que possibilitou um teor superior de sacarose em relação aos outros tratamentos, provavelmente também como uma resposta ao estresse, neste caso o frio. Este aumento no nível de sacarose associado provavelmente a outros fatores de resposta ao estresse, atuou inibindo o desenvolvimento de injúrias pelo frio nos

frutos 'Navelate', os quais são susceptíveis ao frio. O tratamento de cura também mostrou um efeito benéfico contra os sintomas de injúria ao frio em batatas doces (PICHA, 1987), em tomates cv. Daniella (LURIE & SABEHAT, 1997), e em tangerinas 'Fortune' (LAFUENTE *et al.*, 1997 e capítulo 2). A cura também foi eficiente na redução dos danos por frio nas laranjas 'Navelate', os quais apareceram depois de 20 dias a 2°C nos frutos de abril, mas não foi eficiente na redução do "ratat" nas laranjas 'Navelate' e 'Pinalate'. Sabe-se que as laranjas do grupo Navel apresentam uma deficiente ou alterada relação hídrica.

Também houve efeito significativo ($p < 0,05$) para as variáveis temperatura (2 e 12°) e tempo de armazenamento, além das interações entre variedade x temperatura e variedade x tempo de armazenamento. Em comparação aos outros tratamentos predominou uma maior quantidade de sacarose para os frutos curados e armazenados a 2°C durante todo o tempo de armazenamento, com exceção da 1ª colheita de 'Pinalate', onde os frutos com e sem cura a 2°C apresentaram teores próximos de sacarose. Segundo PURVIS (1990) o aumento dos níveis de açúcares durante a exposição a baixa temperatura pode aumentar o turgor da célula e estabilizar as membranas celulares e proteínas em condições de baixa disponibilidade de água.

Com o passar do tempo, o teor de sacarose foi diminuindo para as duas variedades, com ou sem cura, sendo que os frutos armazenados a 12°C apresentaram uma maior queda de sacarose. De maneira geral, ocorreu o mesmo para o teor de amido, indicando um metabolismo mais acelerado com uma maior taxa respiratória. PLAXTON (1996) reportou que as plantas superiores utilizam a sacarose e o amido como os principais substratos para a glicólise, ou seja, na produção de CO₂.

Estatisticamente houve efeito significativo ($p < 0,05$) para a variável pré-tratamento (com e sem cura), e para a interação pré-tratamento x temperatura de armazenamento (2 e 12°C) para os parâmetros glicose e frutose, indicando que os açúcares redutores poderiam ser utilizados na síntese de sacarose provocada pela cura e para manter o nível desta mais alto a 2°C.

Para o parâmetro amido houve efeito significativo ($p < 0,05$) para as variáveis temperatura (2 e 12°C) e tempo de armazenamento, assim como para as interações de pré-tratamento x temperatura e variedade x tempo de armazenamento. Observa-se pela Figura

5 que o tratamento de cura diminuiu o conteúdo de amido, com exceção da 2ª colheita do cultivar Pinalate. Porém a seguir, os frutos curados e armazenados a 2°C mostraram pequeno aumento na quantidade de amido (com exceção da 1ª colheita de 'Pinalate'), sendo que este permaneceu mais elevado que nos outros tratamentos. Segundo KUZNETSOV & SHEVYAKOVA (1997), o amido dos plastídeos representa uma reserva de açúcares e é rapidamente convertido a sacarose em condições de estresse. Com a cura houve uma queda do amido em função do aumento da sacarose, sugerindo uma maior ativação das enzimas de síntese do que de degradação. Nos primeiros 15 dias de armazenamento, os açúcares redutores parecem ser os responsáveis pela manutenção da sacarose dos frutos curados e mantidos a 2°C, além do aumento na concentração de amido em quase todas as amostras analisadas, o que demonstra atuação tanto das enzimas de síntese quanto das de degradação da sacarose. É importante lembrar que a clivagem da sacarose representa o primeiro passo metabólico de biossíntese do amido. A seguir, o teor de amido apresentou uma queda brusca (com exceção da 2ª colheita). De maneira geral, a quantidade de amido de ambas as variedades diminuiu com o tempo de armazenamento, e principalmente de frutos armazenados a 12°C.

A cura pode aumentar o teor de sacarose no flavedo dos frutos cítricos independentemente de que sejam ou não susceptíveis ao frio. Inclusive este aumento pode ser superior ao induzido pelo frio durante tempos maiores de exposição. Os resultados gerais indicam que as mudanças metabólicas observadas durante o armazenamento não são determinantes das diferenças entre as variedades frente ao estresse ao frio, contudo, o aumento em sacarose pode ser um dos mecanismos implicados no efeito benéfico da cura. Os resultados obtidos sugerem que os carboidratos estão relacionados com o mecanismo de resposta ao estresse pelo frio, desencadeado inicialmente pelo tratamento de cura, visando a proteção das membranas celulares. Já que o mutante 'Pinalate' possui maior teor de carboidratos, principalmente sacarose e amido, estes poderiam ser responsabilizados, entre outros fatores, à resistência dos frutos 'Pinalate' ao frio.

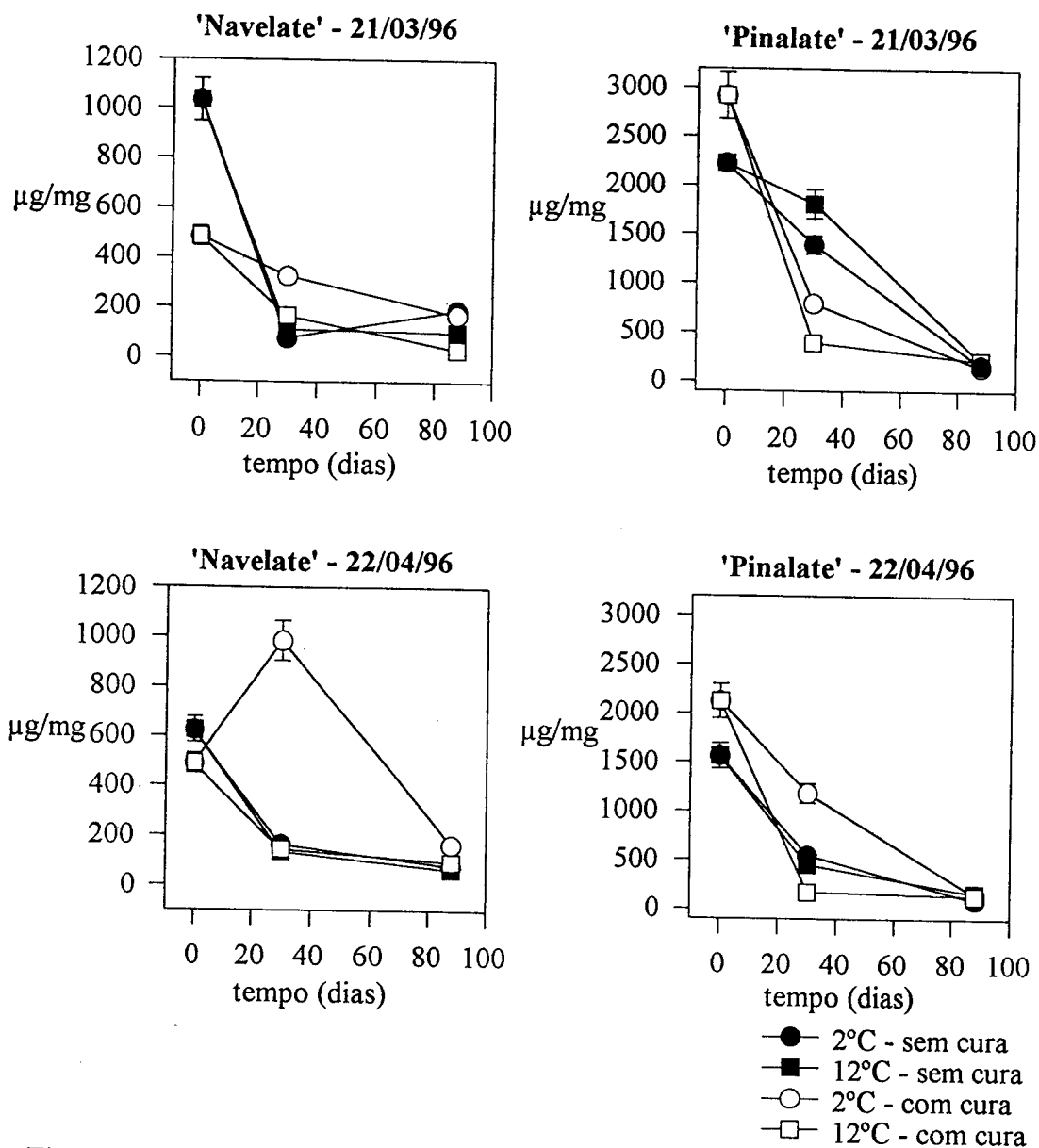


Figura 5: Amido ($\mu\text{g/g}$) do flavedo das laranjas 'Navelate' e 'Pinalate', de duas colheitas, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura.

4.3.3. Atividades das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS V_{max} e Lim) e sacarose sintase (SS), e teor de proteínas totais

Pela Figura 6 observa-se que antes do armazenamento de frutos não curados (tempo zero), da 1ª para a 2ª colheita, houve um aumento da atividade da enzima SPS $V_{\text{máx}}$ para as laranjas 'Navelate' e 'Pinalate', com os seguintes valores médios,

respectivamente: 21,44 a 111,39 $\mu\text{g/g}$ prot. min. e de 53,27 a 151,62 $\mu\text{g/g}$ prot. min.; enquanto a atividade da SS somente elevou-se para a 'Pinalate', como se pode observar pelos valores: 63,75 a 32,60 $\mu\text{g/g}$ prot. min. e de 86,75 a 162,36 $\mu\text{g/g}$ prot. min., respectivamente.

Houve efeito significativo ($p < 0,05$) pelo teste F na variável variedade para as duas enzimas, indicando que tanto a atividade da SPS quanto da SS foi maior para a variedade 'Pinalate'. Este resultado estatístico é compatível com maior quantidade de sacarose, glicose, frutose e amido presentes no flavedo das laranjas 'Pinalate', já que a SPS e SS são enzimas diretamente relacionadas com o metabolismo destes carboidratos. NASCIMENTO *et al.* (1997) reportaram que recentes publicações têm mostrado que a SPS tem um papel central na biossíntese de sacarose a partir das trioses fosfatos no citoplasma de tecidos fotossintetizantes e provavelmente também no acúmulo de sacarose em outros tecidos como sementes e frutos, ligado ou não a transformação do amido. A SS pode catalisar uma reação prontamente reversível, a qual pode se direcionar para a síntese ou para a degradação da sacarose, o que foi observado por GEIGENBERGER & STITT (1993) em batatas e sugerido por IRVING *et al.* (1997) durante a maturação e amadurecimento de *Curcubita maxima* D. 'Delica'. Em muitos trabalhos onde a SS é estudada, a sua atividade é relacionada na direção da degradação da sacarose, sendo considerada por SUNG *et al.* (1989) como a principal enzima catalítica para a clivagem da sacarose em muitos tecidos. Este fato foi verificado no pericarpo de tomates (WANG *et al.*, 1993), melões (HUBBARD *et al.*, 1989), peras asiáticas (MORIGUCHI & YAMAKI, 1988). Porém, também foi concluído por MORIGUCHI *et al.* (1990) que em pêssegos a SS está envolvida na biossíntese da sacarose.

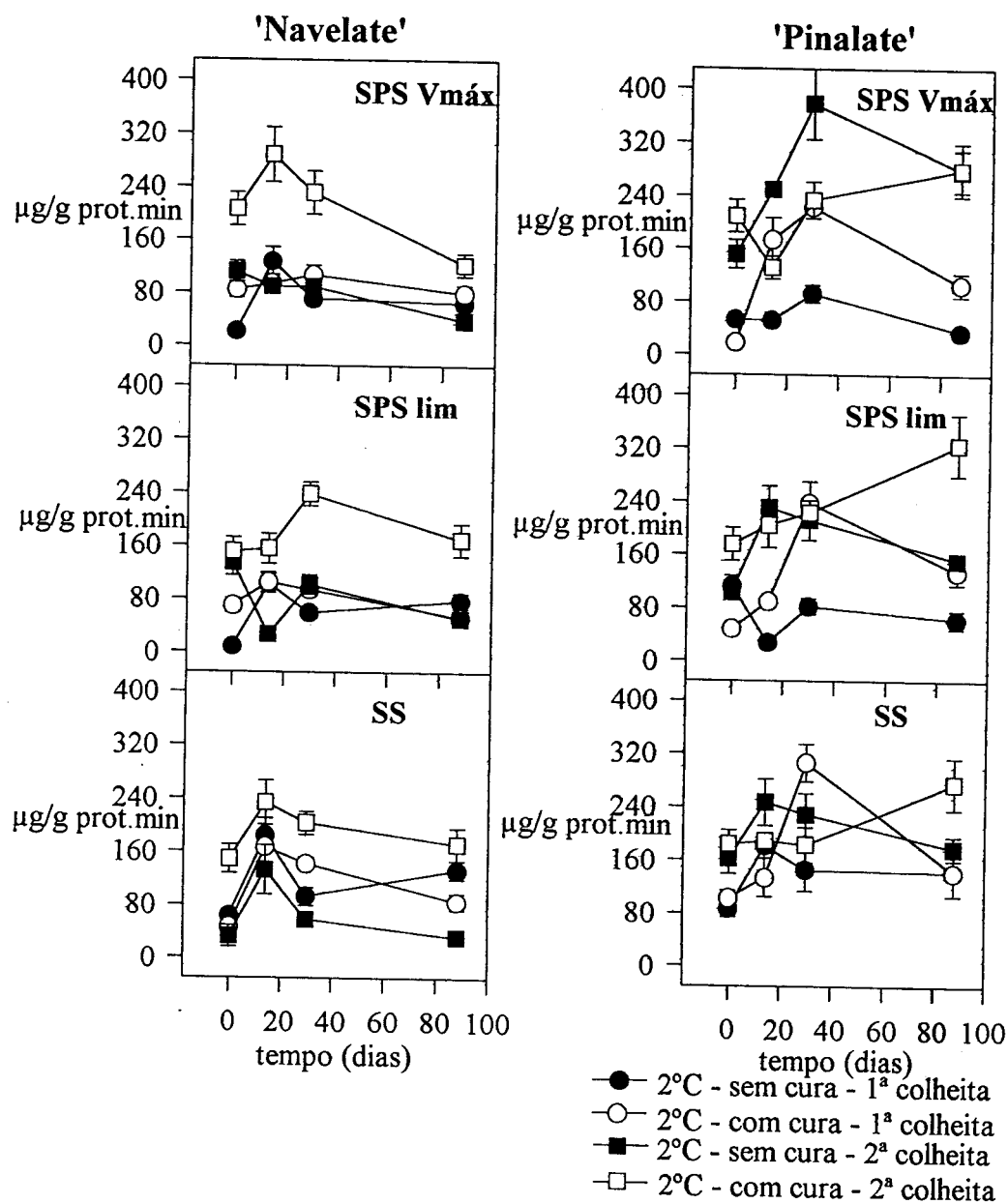


Figura 6: Atividades específicas ($\mu\text{g/g prot. min}$) das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS Vmax e SPS lim) e sacarose sintase (SS) do flavedo das laranjas 'Navelate' e 'Pinalate', de duas colheitas, durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura.

Estatisticamente houve efeito significativo ($p < 0,05$) na variável pré-tratamento (com e sem cura) para o parâmetro SS. Com o tratamento de cura houve um aumento da SPS Vmax e da SS para as duas colheitas dos frutos 'Navelate' e para a 2ª colheita dos

frutos 'Pinalate'. Este aumento coincide com o induzido em sacarose. As enzimas SPS $V_{m\acute{a}x}$ e SS apresentaram correlação positiva significativa com $r = 0,87$ e $0,82$, respectivamente, para a 2^a colheita de 'Navelate'. A enzima SS somente apresentou correlação negativa significativa com a sacarose ($r = -0,96$) na 2^a colheita de 'Pinalate' para os frutos curados

Através da Figura 6, observa-se que, de maneira geral, durante o armazenamento a 2°C tanto a SPS quanto a SS dos frutos curados mantiveram valores acima aos dos frutos não curados. Apesar disso, inicialmente, ambas as enzimas dos frutos sem cura também apresentaram uma elevação nas suas atividades. TOGNETTI *et al* (1990) identificaram um aumento da atividade de SPS e SS de cultivares de trigo mantidas sob baixa temperatura, principalmente de cultivares tolerantes ao frio. Tanto altas temperaturas (como a de cura) quanto as baixas parecem favorecer as atividades das enzimas relacionadas com a síntese e degradação da sacarose.

Também se pode notar que o comportamento da enzima SS se assemelha com o da SPS. Por este fato, não se pode estabelecer uma relação clara entre os níveis de sacarose e as atividades enzimáticas, principalmente quanto a SS, devido a alguns fatores que devem ser considerados: a) HUBBARD *et al.* (1989) reportaram que a concentração de sacarose não aumenta se a atividade da SPS não exceder a soma das atividades das enzimas que degradam a sacarose; b) A SS como se sabe, pode atuar tanto na síntese quanto na clivagem da sacarose; c) Pode haver a presença da invertase, a qual atua irreversivelmente na degradação da sacarose. Apesar de ter sido verificado uma indução pela baixa temperatura na atividade da invertase no flavedo de pomelos (PURVIS & RICE, 1983), não foi possível determinar a atividade da enzima invertase (cida e alcalina) em ambas as variedades estudadas neste trabalho. A impossibilidade de se detectar a invertase ácida foi associada a um provável declneo da atividade desta enzima com o desenvolvimento de frutos pêssegos (MORIGUCHI *et al.*, 1990), melões (HUBBARD *et al.*, 1989) e morangos (POOVAIAH & VELUTHAMBI, 1985).

Somente o fato de ter ocorrido um aumento, de maneira geral, no teor de amido dos frutos curados, assim como uma maior permanência da concentração de amido destes frutos durante o armazenamento a 2°C,  que permite uma relação da SS com a

degradação da sacarose ou ainda permite admitir a presença de uma outra enzima sacarolítica, tal como a invertase.

4.4. CONCLUSÕES

O tratamento de cura inibiu as injúrias pelo frio do flavedo das laranjas 'Navelate'. A cura elevou o teor de sacarose no flavedo dos frutos cítricos independentemente de que sejam ou não susceptíveis ao frio e este manteve-se em quantidade maior nos frutos armazenados a 2°C. Este aumento em sacarose, inclusive, se apresentou superior ao induzido pelo frio durante tempos maiores de exposição, e pode ser um dos mecanismos implicados no efeito benéfico da cura.

Os resultados gerais indicam que as mudanças metabólicas observadas durante o armazenamento não são determinantes das diferenças entre as variedades frente ao estresse ao frio. Porém, o teor maior de sacarose, glicose, frutose, amido e a maior atividade das enzimas SPS e SS nas laranjas 'Pinalate' do que nas 'Navelate' associados às modificações dos açúcares durante a cura e armazenamento sob refrigeração sugerem a relação dos carboidratos, entre outros fatores, com o mecanismo de resposta a estresses, aumentando a resistência do flavedo dos frutos às injúrias pelo frio.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALMELA, V.; AGUSTÍ, M.; JUAN, M. El picado del fruto de la mandarina 'Fortune'. Descripción de la alteración y factores que lo influyen. **Levante Agrícola**, v.319, p.80-86, 1992.
02. BALIBREA, M. E.; SANTA CRUZ, A M.; BOLARÍN, M. C.; PÉREZ-ALFOCEA. Sucrolytic activities in relation to sink strength and carbohydrate composition in tomato fruit growing under salinity. **Plant Science**. v.118, p.47-55. 1996.
03. BEAUDRY, R. M.; SEVERSON, R. F.; BLACK, C. C.; KAYS, S. J. Banana ripening: implications of changes in glycolytic intermediate concentrations glycolytic and gluconeogenic carbon flux, and fructose 2,6-bisphosphate concentration. **Plant Physiology**, v.91, p.1436-1444, 1989.
04. BOHNERT, H. J.; NELSON, D. E.; JENSEN, R. G. Adaptations to environmental stresses. **The Plant Cell**, v.7, p.1099-1111, 1995.

05. EL-OTMANI, M.; COGGINS, C. W., Jr. Fruit age and growth regulator effects on the quantity and structure of the epicuticular wax of 'Washington' Navel orange fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.110, n.3, p.371-378, 1985.
06. GEIGENBERGER, P. STITT, M. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. **Planta**, v.189, p.329-339, 1993.
07. HUBBARD, N. L.; HUBER, S. C.; PHARR, D. M. Sucrose phosphate synthase and acid invertase as determinants of sucrose concentration in developing muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruits. **Plant Physiology**, v.91, p.1527-1534, 1989.
08. IRVING, D. E.; HURST, P. L.; RAGG, J. S. Changes in carbohydrates and carbohydrate metabolizing enzymes during the development, maturation, and ripening of buttercup squash (*Curcubita maxima* D. 'Delica'). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.122, n.3, p.310-314, 1997.
09. KING, A I.; JOYCE, D. C.; REID, M. S. Role of carbohydrates in diurnal chilling sensitivity of tomato seedlings. **Plant Physiology**, v.86, p.764-768, 1988.
10. KUZNETSOV, V. V.; SHEVYAKOVA, N. I. Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.320-326, 1997.
11. LAFTA, A M.; LORENZEN, J. H. Effect of high temperature on plant growth and carbohydrate metabolism in potato. **Plant Physiology**, v.109, p.637-643, 1995.
12. LAFUENTE, M. T.; MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. A; ZACARÍAS, L. Absciscic acid in the response of 'Fortune' mandarins to chilling. Effect of maturity and high-temperature conditioning. **Journal Science of Food Agricultural**, v.73, p.494-502, 1997.
13. LURIE, S.; SABEHAT, A. Prestorage temperature manipulations to reduce chilling injury in tomatoes. **Postharvest Biology and Technology**, v.11, p.57-62, 1997.
14. MCCREADY, R. M. Carbohydrates: composition, distribution, significance. In: **Citrus Science and Technology**, (eds. S. Nagy, P. E. Shaw and M. K. Veldhuis), Westport: AVI Publishing, Inc., 1977, v.1, p.74-109.
15. MEYER, R. F.; BOYER, J. S. Osmoregulation, solute distribution and growth in soybean seedlings having low water potentials. **Planta**, v.151, p. 482-489, 1981.

16. MORIGUCHI, T.; SANADA, T.; YAMAKI, S. Seasonal fluctuations of some enzymes relating to sucrose and sorbitol metabolism in peach fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.115, p.278-281, 1990.
17. MORIGUCHI, T.; YAMAKI, S. Purification and characterization of sucrose synthase from peach (*Prunus persica*) fruit. **Plant Cell Physiology**, v.29, p.1361-1366, 1988.
18. NASCIMENTO, J. R. O; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Partial purification and characterization of sucrose phosphate synthase from preclimacteric and climacteric bananas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.1103-1107, 1997.
19. PETRACEK, P. D.; WARDOWSKI, W. F.; BROWN, G. E. Pitting of grapefruit that resembles chilling injury. **HortScience**, v.30, n.7, p.1422-1426, 1995.
20. PICHA, D. H. Chilling injury, respiration, and sugar changes in sweet potatoes stored at low temperature. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.112, n.3, p.497-502, 1987.
21. PLAXTON, W. C. The organization and regulation of plant glycolysis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p.185-214, 1996.
22. POOVAIAH, B. W.; VELUTHAMBI, K. Auxin-regulated invertase activity in strawberry fruits. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.110, p.258-261, 1985.
23. PREISS, J. Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. **Annual Review of Plant Physiology**, v.33, p.431-454, 1982.
24. PRIMO YUFERA, E.; ROYO, S.; SALA, J.; GASQUE, F. Indice de calidad de las variedades de naranja. I. Planteamiento del problema y comparación de las variedades W. Navel y Navelate. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v.2, p.235-240, 1962.
25. PURVIS, A C. Relation of chilling stress to carbohydrate composition. In: Wang, C. Y. **Chilling Injury of Horticultural Crops**. Boca Ranton: CRC Press, 1990. p.211-221.
26. PURVIS, A C.; RICE, J. D. Low temperature induction of invertase activity in grapefruit flavedo tissue. **Phytochemistry**, v.22, n.4, p.831-834, 1983.
27. RAIKHEL, N.; LAST, R. L. The wide word of plant molecular genetics. **Plant Cell**, v.5, p. 823-825, 1993.

28. SUNG, S. S.; XU, W. P.; BLACK, C. C., Jr. Identification of actively filling sucrose sinks. **Plant Physiology**, v.89, p.1117-1121, 1989.
29. TADEO, J. L.; ORTIZ, J. M.; ESTELLES, A. Sugar changes in clementine and orange fruit during ripening. **Journal of Horticultural Science**, v.62, n.4, p.531-537, 1987.
30. TOGNETTI, J. A.; SALERNO, G. L.; CRESPI, M. D.; PONTIS, H. G. Sucrose and fructan metabolism of different wheat cultivars at chilling temperatures. **Physiologia Plantarum**, v.78, p. 554-559, 1990.
31. WANG, F.; SANZ, A.; BRENNER, M. L.; SMITH, A. Sucrose synthase, starch accumulation, and tomato fruit sink strength. **Plant Physiology**, v.101, p.321-327, 1993.
32. YAKUSHIJI, H.; NONAMI, H.; FUKUYAMA, T.; ONO, S.; TAKAGI, N.; HASHIMOTO, Y. Sugar accumulation enhanced by osmoregulation in Satsuma mandarin fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.121, n.3, p.466-472, 1996.
33. ZACARÍAS, L.; ALFÉREZ, F.; MALLENT, D.; LAFUENTE, M. T. Understanding the role of plant hormone during development and maturation of citrus fruits through the use of plant mutants. **Acta Horticulturae**, v.463, p.89-96, 1997.
34. ZARAGOZA, S.; ALMELA, V.; TADEO, F. R.; PRIMO-MILLO, E.; AGUSTÍ, M. Effectiveness of calcium nitrate and GA₃ on the control of peel-pitting of 'Fortune' mandarin. **Journal of Horticultural Science**, v.71, n.2, p.321-326, 1996.

CAPÍTULO 5

MODIFICAÇÕES NOS COMPONENTES DA PAREDE CELULAR DO FLAVEDO E ALBEDO DE TANGERINAS 'FORTUNE' DURANTE A MATURAÇÃO

MODIFICAÇÕES NOS COMPONENTES DA PAREDE CELULAR DO FLAVEDO E ALBEDO DE TANGERINAS 'FORTUNE' DURANTE A MATURAÇÃO

RESUMO

Foram analisadas as modificações dos constituintes da parede celular do flavedo e albedo durante a maturação de tangerinas da cultivar Fortune de um pomar em Sagunto, Valência - Espanha, e foi avaliada a possível relação entre estas modificações e a susceptibilidade dos frutos ao frio. Foi extraído o material da parede celular ou os sólidos insolúveis em etanol (SIE) e foram determinados os teores de pectina total; frações de pectina solúvel em ácido clorídrico (PSH), solúvel em água (PSA) e solúvel em oxalato de amônia (PSO); grau de esterificação da pectina; hemicelulose e celulose. Verificou-se que os SIE do flavedo e albedo diminuem com a maturação dos frutos devido, principalmente, ao acúmulo de sólidos solúveis em etanol. De maneira geral, o teor dos polissacarídeos estudados foi maior para o albedo do que para o flavedo. A pectina total aumentou até final de janeiro e início de fevereiro para o albedo e flavedo, respectivamente, seguindo-se então uma diminuição. A fração PSH foi a maior seguida da PSO e PSA no flavedo, enquanto no albedo a PSA foi um pouco maior que a PSO. Em geral, todas as frações acompanharam o comportamento da pectina total. O grau de esterificação elevou-se até final de janeiro e depois apresentou uma constante queda, sugerindo a ativação da enzima pectinametilesterase (PME). A variação da hemicelulose e celulose foi pequena, mas é possível que a hemicelulose exerça influência na mudança da textura do albedo e a celulose na do flavedo. Parece haver uma relação entre a susceptibilidade das tangerinas ao frio com as modificações dos polissacarídeos da parede celular durante a maturação dos frutos. Durante a maturação as tangerinas que mostraram uma menor susceptibilidade ao estresse pelo frio apresentaram um menor conteúdo de PSH e hemicelulose e um maior conteúdo de PSA e celulose.

CHANGES IN THE CELL WALL COMPONENTS OF THE FLAVEDO AND ALBEDO OF 'FORTUNE' MANDARINS DURING MATURATION

SUMMARY

Cell wall components changes in the flavedo and albedo of 'Fortune' mandarins, from na orchard in Sagunto, Valencia - Spain, were evaluated and the possible relation among those changes and the fruit susceptibility to the cold-stress was discussed. Cell wall material or ethanol- insoluble solids (EIS) were extracted and the total pectin contents; soluble pectin fractions in chloridric acid (HSP), water-soluble (WSP) and ammonium oxalate-soluble (OSP); degree of esterification; hemicellulose and cellulose were determined. The EIS from flavedo and albedo decreased with fruit maturation probably due to the accumulation of soluble solids in ethanol. In general, the polysaccharides contents were higher in the albedo than in the flavedo. The total pectin increased till the end of January and the beginning of February in the albedo and flavedo, respectively and afterward a decrease occurred. The HSP fraction was the highest in the flavedo followed by the OSP and the WSP fractions. However, the WSP was a bit higher than the OSP in the albedo. In general, all the fractions paralleled the total pectin behavior. The degree of esterification went up by the end of January and thereafter it showed a steady decrease, suggesting the activation of the pectinemethylesterase enzyme (PME). There was a slight variation in hemicellulose and cellulose, but it is possible that the hemicellulose influences the change in the albedo texture and flavedo cellulose. Fruits showing the lowest susceptibility to cold stress along the season had the lowest PSH and hemicelulose and the highest PSA and cellulose.

5.1. INTRODUÇÃO

As tangerinas da cultivar Fortune são tardios, ou seja, a colheita destes frutos inicia-se quando normalmente a oferta no mercado de outras variedades de tangerinas já está se finalizando. Este fato torna o cultivo dos frutos 'Fortune' atraente economicamente. Porém, como são tangerinas muito susceptíveis à injúria pelo frio tanto no campo quanto sob armazenamento a baixas temperaturas, a possível depreciação da sua aparência externa torna-se um problema aos produtores.

MITCHAM & McDONALD (1993), reportaram que várias desordens pós-colheita de frutos cítricos têm sido associadas a exocarpos imaturos ou muito maduros. Os frutos são colhidos baseando-se na sua maturidade interna, entretanto, a maior parte dos problemas pós-colheita são relacionados ao albedo e ao flavedo. Têm sido realizadas poucas análises para avaliar as modificações dos constituintes do flavedo, a porção colorida do exocarpo com cerca de 1-2 mm de espessura, e do albedo, a camada inferior esponjosa branca. Embora ocorram muitas mudanças nos componentes químicos do exocarpo, a maturidade neste tecido frequentemente refere-se a susceptibilidade às injúrias (BURNS & BALDWIN, 1994).

De acordo com McNEIL *et al.* (1984) o colapso do tecido que ocorre no estágio secundário da injúria pelo frio pode resultar do colapso das paredes celulares. O sistema de suporte da parede celular não tem sido completamente definido, mas tem sido aceita a idéia de que celulose, hemicelulose, pectina e glicoproteína, covalentemente ligadas, formam uma "rede de malha".

Neste trabalho têm-se os objetivos de analisar as modificações dos polissacarídeos da parede celular do flavedo e albedo das tangerinas da cultivar Fortune durante a maturação, e avaliar uma possível relação entre estas modificações e a susceptibilidade dos frutos ao frio.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Material vegetal

Foram coletadas ao acaso de 12 árvores adultas, tangerinas da cultivar Fortune (*Citrus clementine* Hort. ex Tanaka x *Citrus reticulata*, Blanco), um híbrido de

clementino Fino e mandarino Dancy, situadas em um pomar em Sagunto, Valência - Espanha. Foram colhidos periodicamente (cada 15 a 20 dias) 45 frutos, sendo 3 repetições de 15 frutos, desde novembro de 1996 até abril de 1997, a fim de se avaliar as mudanças dos constituintes da parede celular do flavedo e albedo. Estes foram obtidos dos frutos, picados, homogeneizados, acondicionados em embalagens plásticas (PVC), congelados em nitrogênio líquido e armazenados em câmara fria a -80°C. Posteriormente esse material foi liofilizado e triturado em moinho de facas.

No pomar de Sagunto, as temperaturas mínimas e máximas e umidades relativas médias dos meses de dezembro, janeiro e fevereiro de 1993/94 foram, respectivamente: 4,07, 18,26°C; 3,69, 17,00°C e 5,17, 18,90°C; 61,90%, 54,04% e 52,91%. E em 1996/97 foram, respectivamente: 6,70, 16,86°C; 6,47, 14,95°C e 5,15, 18,87°C; 67,48%, 69,61% e 64,75%.

5.2.2. Análise estatística

A apresentação descritiva das análises dos frutos foi feita através de gráficos de linhas com apresentação de médias e erros padrões.

5.2.3. Análises realizadas para a curva de maturação

5.2.3.1. Extração do material de parede celular

A extração da parede celular foi realizada de acordo com SHWELFET (1965) e SELVENDRAN & RYDEN (1990). Do flavedo e do albedo liofilizados e triturados foram pesados 1,5 gramas, adicionados 80 ml de etanol 80 % e mantido em ebulição por 15 minutos. Após o resfriamento a temperatura ambiente, a mistura foi filtrada em funil de Buchner. O resíduo (sólidos insolúveis em etanol - SIE) foi lavado 4 vezes com 50 ml de etanol 95% e uma vez com etanol absoluto. A seguir houve uma lavagem com 15 ml de fenol-ácido acético-água (2:1:1) e então os SIE permaneceram por uma noite com 10 ml de dimetilsulfóxido 90%, a fim de remover o amido existente. Por fim foram realizadas duas lavagens com 50 ml de acetona e o resíduo foi seco a 48°C.

Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem (%) do flavedo e albedo liofilizados utilizados na extração.

5.2.3.2. Determinação das frações pécticas

Na extração das frações pécticas (MANGAS *et al.*, 1992), 0,1 g dos SIE foram sequencialmente extraídos, da seguinte maneira:

1) Pectina solúvel em água (PSA): foi obtida de três extrações aquosas (30 ml cada), a 25°C sob agitação por 30, 30 e 15 minutos, respectivamente. Os extratos foram combinados e completados para 100 ml.

2) Pectina solúvel em oxalato de amônia a 0,75 % (PSO): esta fração foi extraída três vezes a 25°C com 15 ml de oxalato de amônia a 0,75 % sob agitação por 30, 15 e 15 minutos, respectivamente. O volume final foi completado para 50 ml.

3) Pectina solúvel em ácido clorídrico (PSH): foi extraída com três porções de 30 ml de ácido clorídrico 0,05 M com agitação por 45 minutos a 85°C cada vez. O volume final foi de 100 ml.

Das frações pécticas extraídas foram utilizados 1,0, 0,2 e 0,5 ml, respectivamente, para o doseamento do ácido urônico pelo método espectrofotométrico do m-fenilfenol (m-hidroxidifenil) (BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN 1973), com comprimento de onda de 520 nm. Os resultados foram expressos em mg de fração péctica por grama de SIE do flavedo e albedo liofilizados.

5.2.3.3. Determinação da pectina total

A concentração de substâncias pécticas totais foi determinada diretamente de 25 mg da porção de sólidos insolúveis em álcool, através do tratamento com 3 ml de EDTA 0,5% a pH 11,5 por 30 minutos, com subsequente diminuição do pH para 5,5 e exposição da amostra à pectinase por 60 minutos. A seguir a solução da amostra foi colocada em balão volumétrico de 50 ml, sendo que o volume deste foi completado com água destilada. Desta diluição utilizou-se 0,25 ml para o doseamento da pectina total pelo método do m-fenilfenol citado anteriormente.

Os resultados obtidos foram expressos em mg de pectina total por grama de SIE do flavedo e albedo liofilizados.

5.2.3.4. Determinação do grau de esterificação - GE (%)

Foi determinado através da incubação de 5 mg da amostra do SIE por uma noite, com 2,5 ml de tetraborato de sódio (10 mg/ml em etanol 50%). Em seguida a amostra foi

neutralizada com ácido acético até terminar a efervescência e lavada várias vezes com ácido acético-metanol (1:9) e com metanol. Depois foi dissolvida em 3 ml de ácido sulfúrico (67%) gelado e então os ácidos urônicos foram doseados pelo método do m-fenilfenol a partir de uma alíquota de 0,3 ml. A incubação com tetraborato de sódio converte os resíduos galacturonosil esterificados em galactose e a diferença no conteúdo de ácidos urônicos das amostras antes e depois da redução com tetraborato de sódio, representa a quantidade de ácido urônico que continha metil ésteres (KIM & CARPITA, 1992). O cálculo do grau de esterificação foi realizado através da expressão de MANESS *et al.* (1990):

$$GE (\%) = [(\text{ácido urônico total antes da redução}) - (\text{ácido urônico total após a redução}) / (\text{ácido urônico total antes da redução})] \times 100$$

5.2.3.5. Determinação de hemicelulose e celulose

Amostras de 5mg da porção de SIE foram extraídas com 2 ml de ácido trifluoroacético (TFA) 2 N a 120°C por 1 hora em tubos vedados. Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado, medido o seu volume e a partir de 0,05 ml deste foi determinada a hemicelulose pelo método espectrofotométrico de antrona (SOUTHGATE, 1991) utilizando-se comprimento de onda de 620 nm. O precipitado foi dissolvido em 3 ml de ácido sulfúrico 72% e a partir de 0,1 ml foi analisada a celulose também pelo método de antrona.

Os resultados obtidos foram expressos em mg de hemicelulose e celulose por grama de SIE do flavedo e albedo liofilizados.

5.2.3.6. Escala subjetiva de danos por frio no flavedo

Os danos pelo frio nos frutos foram avaliados conforme descrito no capítulo 2.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Material de parede celular

O teor do material de parede celular ou os sólidos insolúveis em etanol (SIE), extraídos do flavedo e do albedo das tangerinas 'Fortune', apresentaram uma queda constante durante a maturação dos frutos (Figura 1). A variação dos SIE foi de 51,13% para 24,62% e de 74,45% para 49,65% no flavedo e albedo, respectivamente.

Proporcionalmente, portanto, a diminuição dos SIE foi maior no flavedo (51,85%) do que no albedo (33,31%) das tangerinas. MALIS-ARAD *et al.* (1983) verificaram que em 4 diferentes cultivares de tomate a concentração de SIE diminuiu com o desenvolvimento dos frutos. TING & DESZYCK (1960) estudaram o exocarpo (flavedo junto com o albedo) de 3 variedades de laranjas e uma de pomelo, e verificaram que os SIE constituíram cerca de 70% dos sólidos totais em frutos imaturos e cerca de 50% em frutos maduros. No exocarpo de laranjas 'Valencia', EAKS & SINCLAIR (1980) reportaram uma variação bem próxima, de 76,7% de SIE para frutos imaturos e 53,0% para frutos maduros.

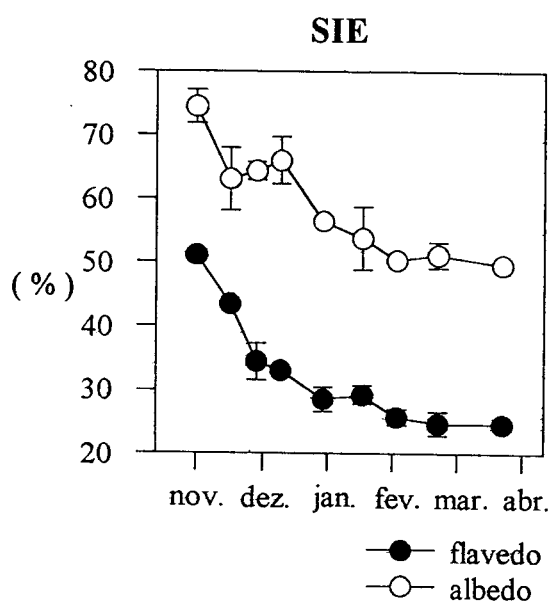


Figura 1: Sólidos insolúveis em etanol (SIE -%) do flavedo e albedo de tangerinas 'Fortune' durante a maturação.

A diminuição do teor de SIE durante a maturação, provavelmente seja devido ao crescente acúmulo de açúcares solúveis em etanol nos sólidos totais, além da conversão de substâncias pécticas a compostos solúveis em etanol, como verificaram ROE & BRUEMMER (1981). No caso das tangerinas da cultivar Fortune, os açúcares solúveis em etanol tratam-se principalmente de glicose e frutose, como foi visto no capítulo 2.

Houve também um acúmulo de amido durante a maturação dos frutos, o que levaria a um aumento dos SIE, porém a quantidade de amido acumulada é muito pequena comparada a dos açúcares redutores e sacarose. Segundo TING & DESZYCK, 1960) além dos açúcares, os ácidos orgânicos e seus sais, aminoácidos, flavonóides, vitaminas e compostos voláteis constituem a fração solúvel em etanol do exocarpo de frutos cítricos.

Em maçãs, PERCY *et al.* (1997) verificaram também diminuição da quantidade de material da parede celular durante o desenvolvimento dos frutos. Porém, como a extração foi em peso fresco, os autores reportaram que a redução do material pode ser devido a um aumento no tamanho celular e ao desenvolvimento de ar nos espaços intracelulares.

5.3.2. Pectina total e grau de esterificação

Os principais carboidratos estruturais do flavedo e do albedo de frutos cítricos estão presentes nas frações de pectina, hemicelulose e celulose da parede celular. De acordo com VAN BUREN (1979), a celulose tem a função de prover rigidez e resistência ao rompimento, enquanto as pectinas e hemiceluloses contribuem para a plasticidade e habilidade de estiramento.

Na Figura 2 observa-se que a concentração de pectina total aumentou até final de janeiro e meados de fevereiro (quando o fruto atinge o índice de maturidade comercial) para o albedo e flavedo, respectivamente; seguindo-se então uma diminuição. A quantidade de pectina total do albedo foi sempre superior ao do flavedo, porém em níveis bem próximos.

A pectina de frutos cítricos é produzida comercialmente do tecido de albedo, onde a parede celular primária contém grande quantidade de pectina de alto peso molecular. O peso molecular e o grau de metilação são importantes comercialmente, pois têm um efeito na habilidade da pectina em formar géis (NELSON *et al.*, 1977 *apud* BALDWIN, 1996).

MANESS *et al.* (1990) reportaram que a alta proporção de ácido galacturônico na maior parte das pectinas de plantas confere um caráter altamente ácido aos polissacarídeos e facilita as interações iônicas com o cálcio. Este caráter ácido é alterado pela adição ou remoção de grupos metil ésteres dos resíduos de ácido galacturônico. De acordo com STEELE *et al.* (1997), presume-se que o evento de desesterificação é uma consequência

primária da atividade da PME, a qual remove os grupos metilésteres da posição do C6 nos resíduos galacturonosil dos polissacarídeos pécticos. A cadeia de ácidos galacturônicos torna-se então, susceptível a atividade da PG.

Pela Figura 2 observa-se que o grau de esterificação (GE) do albedo apresentou um crescente aumento até o início do mês de janeiro (09/01/1997), quando os frutos estão “de vez” com um valor de 40,83%, e a partir daí baixou até 27,47%. O flavedo que até final de dezembro apresentou um GE baixo (6,71%) elevou-se acentuadamente estando no início de janeiro superior ao do albedo (49,34%), a seguir acompanhou a queda ocorrida no albedo porém apresentando valores sempre um pouco acima. Os resultados deste trabalho sugerem uma ativação contínua da enzima PME depois do início de janeiro (09/01/1997, onde houve um pico no GE), deixando a cadeia de ácidos galacturônicos susceptíveis a PG. Porém, não é sempre que a atividade da PME está relacionada com o amolecimento dos frutos (AHMED & LABAVITCH, 1980). Foi reportado por MANABE & TARUTANI (1965) uma alta atividade de PME em frutos de tangerina ‘Satsuma’ durante a maturação bem como durante o armazenamento.

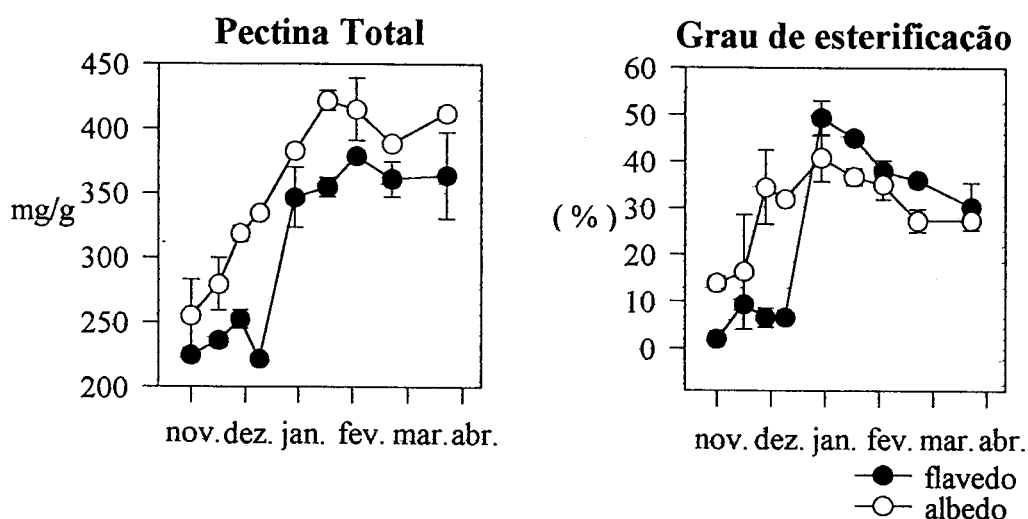


Figura 2: Pectina total (mg/g) e grau de esterificação da pectina (%) do flavedo e albedo de tangerinas ‘Fortune’ durante a maturação.

KOCH & NEVINS (1989) reportaram que o GE péctica caiu de 90% em tomates verdes imaturos para 30% no estágio de amadurecimento vermelho-maturo. No exocarpo de frutos cítricos, ALEXANDER & SULEBELE (1980) determinaram o GE e

encontraram os seguintes valores: 63,2%, 56,1%, 57,0% e 57,1% para lima, laranja, laranja doce e pomelo, respectivamente. O GE das tangerinas 'Fortune' de cerca de 60%, quando estas atingem a maturidade comercial, está entre estes valores determinados em frutos cítricos.

5.3.3. Frações pécticas

As pectinas nos frutos encontram-se sob diferentes formas, caracterizadas por diferentes solubilidades. A protopectina é uma forma insolúvel em água e que por hidrólise parcial produz ácidos pectínicos (esterificados com grupos metílicos) ou ácidos pécticos (sem esterificação) também chamados de pectinas solúveis (CHITARRA & CHITARRA, 1990). Para a quantificação destas frações pode-se utilizar a solubilização dos ácidos pectínicos em água, dos ácidos pécticos em oxalato de amônia 0,75% e da protopectina em solução de HCl 0,05 M.

Durante a maturação, as frações pécticas do flavedo e do albedo (Figura 3), apresentaram um comportamento flutuante muito similar, assim como em relação a pectina total. A fração protopectina é a maior entre as três e está presente em maior concentração no albedo. Quanto as outras frações, o flavedo é mais rico em ácidos pécticos do que em ácidos pectínicos, enquanto ocorre o contrário para o albedo. Com a diminuição do teor da fração protopectina no mês de fevereiro (início da maturidade comercial) não houve um conseqüente aumento nas outras duas frações, a não ser um leve aumento em ácidos pectínicos do albedo, e o nível de ácidos pécticos do flavedo que parece voltar a ter pequena elevação nos meses de março e abril.

As frações pécticas se modificam de forma distinta nos diferentes frutos durante a maturação e amadurecimento. Mas, de uma maneira geral, a fração protopectina diminui com o amadurecimento. MALIS-ARAD *et al.* (1983) reportaram que a perda de firmeza de cultivares de tomate foi acompanhada por uma diminuição em substâncias pécticas insolúveis (protopectina) e um aumento em material péctico solúvel em água, enquanto ROE & BRUEMMER (1981) observaram que em mangas a perda da firmeza se relacionou com o declínio em pectinas solúveis em água (ácidos pectínicos) e álcali (protopectina) e com o aumento em pectina solúvel em oxalato de amônia (ácidos pécticos). NAOHARA & MANABE (1987) analisaram o conteúdo de pectina total e suas

frações em tangerinas ‘Satsuma’ e as modificações observadas foram as mesmas que para os frutos ‘Fortune’; a concentração de pectina total aumentou durante a maturação sendo o aumento da fração (PSH) o mais acentuado.

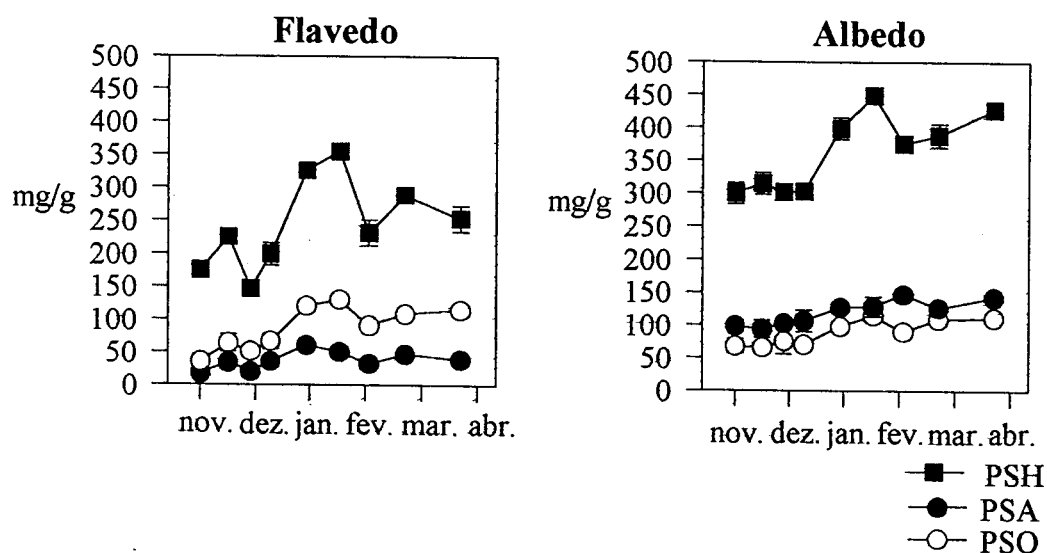


Figura 3: Frações pécicas (mg/g) do flavedo e albedo de tangerinas ‘Fortune’ durante a maturação: pectina solúvel em HCl (PSH), pectina solúvel em água (PSA) e pectina solúvel em oxalato de amônia (PSO).

As modificações na textura de frutos e hortaliças são geralmente atribuídas ao metabolismo de polissacarídeos, os quais são constituintes da parede celular e lamela média (REDGWELL *et al.*, 1992). De acordo com SIMANDJUNTAK *et al.* (1996), as modificações mais reportadas na estrutura celular de muitos frutos são: aumento em poliuronídeos solúveis, os quais são liberados da fração pécica; e a perda de resíduos de galactose e arabinose. As mudanças na composição da parede celular geralmente resultam da ação de enzimas hidrolíticas produzidas pelo fruto. Entre estas, as poligalacturonase (PG) e pectinametilesterase (PME) se sobressaem por causa das expressivas mudanças no teor de pectina da parede celular, as quais são observadas no amadurecimento de frutos, e as atividades destas duas enzimas freqüentemente aumentam durante o amadurecimento. Segundo FISCHER & BENNETT (1991) somando-se a estas tem sido atribuído papéis no

metabolismo de parede celular dos frutos à uma variedade de glucanases e glucosidases. Em um estudo das atividades de glucosidases em pomelos, BURNS & BALDWIN (1994), verificaram que a atividade da β -galactosidase do flavedo pode estar envolvida nas modificações de açúcares neutros da parede celular quando ainda podem estar ocorrendo divisões celulares. A α -manosidase, inicialmente baixa no flavedo, aumenta com o avanço da maturação. As tendências nas atividades de glicosidases do albedo foram similares, porém mais atenuadas.

5.3.4. Hemicelulose e celulose

CARPITA & GIBEAUT (1993) reportaram que além da pectina outros constituintes da parede celular também influem na textura do fruto. As microfibrilas de celulose formam uma forte cadeia ao redor de cada célula e são interligadas com hemiceluloses, e esta cadeia é susceptível às modificações relacionadas com o amadurecimento.

Na Figura 4 verifica-se que durante a maturação das tangerinas, o teor de hemicelulose do flavedo e albedo mostrou uma pequena flutuação paralela até final de janeiro. Após esta época, a hemicelulose do albedo teve uma constante queda, de 220,18 para 148,25 mg/g de SIE, enquanto no flavedo houve mais um aumento antes da queda, e somente nesta fase o seu teor foi maior do que no albedo. O início da diminuição da hemicelulose no albedo (27/01/97) coincidiu com a da pectina total e fração protopectina (PSA), e possivelmente, o conjunto destas mudanças pode ter influenciado na modificação da textura. McCOLLUM *et al.* (1989) e SIMANDJUNTAK *et al.* (1996) verificaram modificações nos polissacarídeos de pectina e hemicelulose, e uma perda líquida de açúcares neutros não celulósicos da parede celular do melão durante o processo de amolecimento. Os primeiros autores sugerem que o metabolismo da hemicelulose pode estar relacionado ao aumento da pectina solúvel. A solubilidade da pectina pode aumentar como um resultado da clivagem enzimática de ligações entre pectinas e hemiceluloses.

Já no flavedo, a hemicelulose não parece estar relacionada com a textura, mas talvez a celulose sim, uma vez que esta depois de uma pequena variação flutuante, apresentou uma diminuição contínua após o final do mês de janeiro (27/01/97). Este fato sugere uma possível ativação da enzima celulase. O aumento da celulase já foi descrito por

KURAOKA *et al.* (1975) durante o desenvolvimento do exocarpo de tangerinas 'Satsuma', e por ABELES & TAKEDA (1990) durante o amolecimento de morangos, frutos não-climatéricos. No teor de celulose do albedo houve uma variação muito pequena durante a maturação, tornando-se difícil relacioná-la com modificações na textura. Apesar de próximos, os valores de celulose do albedo foram sempre superiores ao do flavedo.

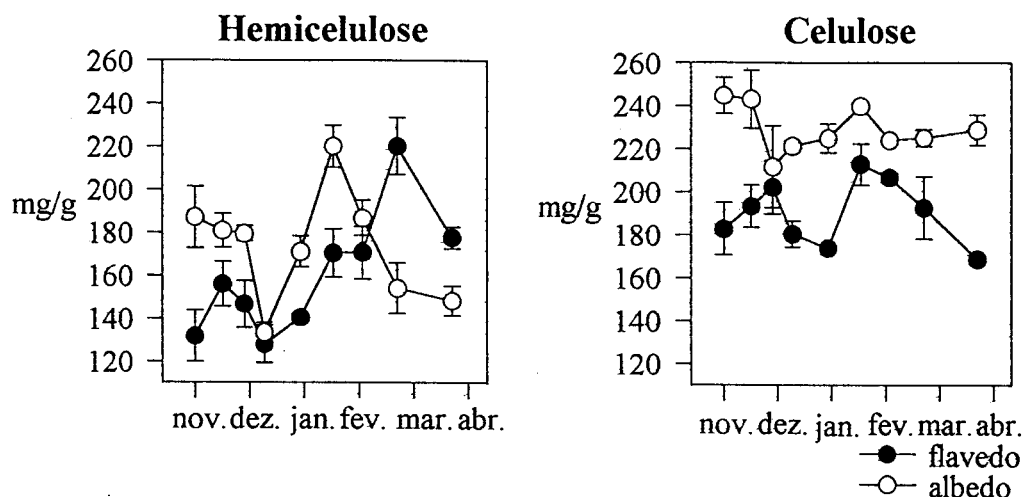


Figura 4: Hemicelulose (mg/g) e celulose (mg/g) do flavedo e albedo de tangerinas 'Fortune' durante a maturação.

TING & DESZYCK (1960) analisaram mensalmente, por cinco vezes, os polissacarídeos dos SIE do exocarpo de três cultivares de laranja e encontraram valores que variaram de 8,5 a 12,6% de SIE para a hemicelulose e de 21,2 a 40,4% de SIE para a celulose, dependendo da cultivar e da época da análise. Comparando-se estes resultados com os obtidos das tangerinas 'Fortune', verifica-se que nestas o nível de hemicelulose mostrou-se maior e o nível de celulose aproximou-se do valor mais baixo relatado pelos autores. Porém, trata-se de uma comparação aproximada, já que o flavedo e albedo das tangerinas da cultivar Fortune foram analisados separadamente.

A estrutura da parede celular pode estar relacionada com a susceptibilidade aos danos por frio do flavedo. Nos dados da Tabela 1, observa-se menor teor da fração insolúvel da pectina (PSH) e de hemicelulose da parede celular quando houve um maior índice de danos por frio no flavedo dos frutos, enquanto que a PSA e celulose encontram-

se em maior quantidade com o menor índice de danos pelo frio. GRANT *et al.* (1992) reportaram que com o desenvolvimento de injúria por frio em caquis houve solubilização de material da parede celular, com a liberação de poliuronídeo de grande massa molecular sem ocorrer uma degradação. MERCER & SMITTLE também verificaram que em condições de armazenamento que resultaram em injúria por frio mais severa em pepinos, houve aumento da concentração de componentes pécticos mais solúveis; o teor de hemicelulose foi mais alto e o de celulose mais baixo nas porções injuriadas da pele do pepino do que nas não injuriadas.

Colheita (data)	I.D.F.	Fração insolúvel da pectina	Hemicelulose	Celulose
09/12/1996	1,40	19,91	146,74	202,21
27/01/1997	0,67	50,52	170,54	212,85
03/03/1997	0,80	46,72	220,28	192,72

Tabela 1: Índice de danos por frio (IDF) de tangerinas ‘Fortune’ e teor dos polissacarídeos (mg/g SIE) da parede celular do flavedo de frutos armazenados a 2°C por 28 dias.

5.4. CONCLUSÕES

Os SIE do flavedo e albedo diminuíram com a maturação das tangerinas, principalmente devido ao aumento de sólidos solúveis em etanol.

O aumento da pectina total e da fração de pectina solúvel em ácido (PSH) no flavedo e no albedo, seguido de diminuição em ambas após o final de janeiro (27/01/1997), foram as modificações mais acentuadas durante a maturação. O grau de esterificação também acompanhou este comportamento, porém com uma maior queda.

A variação da hemicelulose e da celulose foi pequena, mas é provável que a primeira tenha influência na mudança da textura do albedo e a celulose na do flavedo.

Parece haver uma relação entre o índice de danos pelo frio dos frutos com as modificações dos constituintes da parede celular analisados durante a maturação.

5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ABELES, F. B.; TAKEDA, F. Cellulase activity and ethylene in ripening strawberry and apple fruits. **Scientia Horticulturae**, v.42, p.269-275, 1990.
02. AHMED A E.; LABAVITCH, J. M. Cell wall metabolism in ripening fruit. II. Changes in carbohydrate-degrading enzymes in ripening 'Bartlett' pears. **Plant Physiology**, v.65, p.1009-1013, 1980.
03. ALEXANDER, M. M.; SULEBELE, G. A. Characterisation of pectins from indian citrus peels. **Journal of Food Science and Technology**, v.17, p.180-182, 1980.
04. BALDWIN, E. A. Citrus fruit. In: Seymour, G. B.; Taylor, J. E.; Tucker, G. A. **Biochemistry of Fruit Ripening**. 2ª ed. London: Chapman & Hall, 1996. cap 4: p.107-137.
05. BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of microgram quantities of uronic acids. **Analytical Biochemistry**, v.54, p.484-489, 1973.
06. BURNS, J. K.; BALDWIN, E. A. Glycosidase activities in grapefruit flavedo, albedo and juice vesicles during maturation and senescence. **Physiologia Plantarum**, v.90, p.37-44, 1994.
07. CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, v.3, p.1-30, 1993.
08. CHITARRA, M. I. F. & CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras, ESAL/FAEPE, 1990. 320p.
09. EAKS, I. L.; SINCLAIR, W. B. Cellulose-hemicellulose fractions in the alcohol-insoluble solids of Valencia orange peel. **Journal of Food Science**, v.45, p.985-988, 1980.
10. FISCHER, R. L.; BENNETT, A. B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42, p.675-703, 1991.
11. GRANT, T. M.; MACRAE, E. A; REDGWELL, R. J. Effect of chilling injury on physicochemical properties of persimmon cell walls. **Phytochemistry**, v.31, n.11, p.3739-3744, 1992.
12. KIM, J-B; CARPITA, N. C. Changes in esterification of the uronic acid groups of cell wall polysaccharides during elongation of maize coleoptiles. **Plant Physiology**, v.98, p.646-653, 1992.

13. KOCH, J. L.; NEVINS, D. J. Tomato fruit cell-wall. I. Use of purified tomato polygalacturonase and pectin methyl-esterase to identify developmental changes in pectins. **Plant Physiology**, v.91, p.816-822, 1989.
14. KURAOKA, T.; IWASKI, K.; TSUJI, H. Studies on the peel puffing of the Satsuma mandarin. II. Changes of cell morphology and cellulase activity during the development of the fruit rind. **Journal Japanese Society of Horticultural Science**, v.44, p.7-14, 1975.
15. MALIS-ARAD, S.; DIDI, S.; MIZRAHI, Y. Pectic substances: changes in soft and firm tomato cultivars and in non-ripening mutants. **Journal of Horticultural Science**, v.58, n.1, p.111-116, 1983.
16. MANABE, M.; TARUTANI, T. On the utilization of pectinesterase in mandarin orange. **Journal Japanese Society of Food Science and Technology**, v.12, p.432-438, 1965.
17. MANESS, N. O.; RYAN, J. D.; MORT, A. J. Determination of the degree of methyl esterification of pectins in small samples by selective reduction of esterified galacturonic acid to galactose. **Analytical Biochemistry**, v.185, p.346-352, 1990.
18. MANGAS, J. J.; DAPENA, E.; RODRÍGUEZ, M. S.; MORENO, J.; GUTIÉRREZ, M. D.; BLANCO, D. Changes in pectic fractions during ripening of cider apples. **HortScience**, v.27, n.4, p.328-330, 1992.
19. McCOLLUM T. G.; HUBER, D. J.; CANTLIFFE, D. J. Modification of polyuronides and hemicelluloses during muskmelon fruit softening. **Physiologia Plantarum**, v.76, p.303-308, 1989.
20. McNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, v.53, p.625-663, 1984.
21. MERCER, M. D.; SMITTLE, D. A. Storage atmospheres influence chilling injury and chilling injury-induced changes in cell wall polysaccharides of cucumber. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.117, n.6, p.930-933, 1992.
22. MITCHAM, E. J.; McDONALD, R. E. Changes in grapefruit flavedo cell wall noncellulosic neutral sugar composition. **Phytochemistry**, v.34, n.5, p.1235-1239, 1993.
23. NAOHARA, J.; MANABE, M. Quantitative and qualitative changes of pectin during development of satsuma mandarin fruits (*Citrus unshiu* Marc.). **Journal Japanese Society of Food Science and Technology**, v.34, p.386-391, 1987.

24. PERCY, A E.; MELTON, L. D.; JAMESON, P. E. Xyloglucan and hemicelluloses in the cell wall during apple fruit development and ripening. **Plant Science**, v.125, p.31-39, 1997.
25. REDGWELL, R. J.; MELTON, L. D.; BRASCH, D. J. Cell wall dissolution in repening kiwifruit. **Plant Physiology**, v.98, p.71-81, 1992.
26. ROE, B.; BRUEMMER, J. H. Changes in pectic substances and enzymes during ripening and storage of "keitt" mangos. **Journal of Food Science**, v.46, p.186-189, 1981.
27. SELVENDRAN, R. R.; RYDEN, P. Isolation and analysis of plant cell walls. In: DEY, P. M. & HARBORNE, J. B. **Methods in Plant Biochemistry**. Ed. P. M. Dey. London: Academic Press, 1990. vol.2, pp.549-580
28. SHEWFELT, A L. Changes and variations in the pectic constitution of ripening peaches as related to product firmness. **Journal of Food Science**, v.30, p.573-576, 1965.
29. SIMANDJUNTAK, V.; BARRETT, D. M.; WROLSTAD, R. E. Cultivar and maturity effects on muskmelon (*Cucumis melo*) colour, texture and cell wall polysaccharide composition. **Journal Science Food Agricultural**, v.71, p.282-290, 1996.
30. SOUTHGATE, D. A T. **Determination of foods carbohydrates**, London: Elservier Applied Science, 1991, 232p.
31. STEELE, N. M.; McCANN, M. C.; ROBERTS, K. Pectin modification in cell walls of ripening tomatoes occurs in distinct domains. **Plant Physiology**, v.114, p.373-381, 1997.
32. TING, S. V.; DESZYCK, E. J. The carbohydrates in the peel of oranges and grapefruit. **Florida Agricultural Experiment Stations Journal Series**, n.1093, p.146-152, 1960.
33. VAN BUREN, J. P. The chemistry of texture in fruits and vegetables. **Journal of Texture Studies**, v.10, p.1-23, 1979.

CAPÍTULO 6

MODIFICAÇÕES DOS COMPONENTES DA PAREDE CELULAR DE TANGERINAS 'FORTUNE' INDUZIDAS PELA ALTA TEMPERATURA E DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO

MODIFICAÇÕES DOS COMPONENTES DA PAREDE CELULAR DE TANGERINAS 'FORTUNE' INDUZIDAS PELA ALTA TEMPERATURA E DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO

RESUMO

Frutos de tangerinas da cultivar Fortune foram colhidos em três estádios de maturação de árvores adultas de um pomar em Sagunto, Valência - Espanha. Nestes frutos foi avaliado o efeito de 3 dias de acondicionamento sob calor (cura) na susceptibilidade ao frio e nas modificações dos componentes da parede celular. Os frutos curados e não curados foram armazenados a 2°C (temperatura que provoca injúrias) e 12°C (temperatura controle) e UR de 90-95%. No "ponto zero" (controle) e 30 dias de armazenamento foram colhidas amostras de flavedo e albedo para a extração e análises dos constituintes da parede celular, tais como: pectina total, grau de esterificação, frações pécnicas, hemicelulose e celulose. Observou-se que em todos os tratamentos o albedo apresentou maior conteúdo de material de parede celular ou sólidos insolúveis em etanol (SIE), e em geral, também apresentou maior concentração de pectina total, hemicelulose e celulose do que o flavedo nos tratamentos aplicados. Principalmente nos frutos colhidos em final de janeiro (estádio II de maturação) ocorreu aumento de SIE com o tratamento de cura e 30 dias de armazenamento, quando o exocarpo das tangerinas possui maior quantidade de açúcares redutores e de sacarose. Após a cura e 30 dias de armazenamento o teor de pectina total também aumentou no flavedo e albedo de frutos colhidos nos estádios I e II de maturação, mas diminuiu naqueles do estágio III. O flavedo apresentou maior diminuição do grau de esterificação (GE) do que o albedo durante o armazenamento, principalmente nos estádios II e III. No estágio III, quando os frutos estão mais maduros, houve melhor relação entre a diminuição da fração insolúvel de pectina - PSH (pectina solúvel em HCl) e o aumento das frações solúveis da pectina - PSA e PSO, frações solúveis em água e oxalato de amônia, respectivamente. Nos três estádios de maturação e em todos os tratamentos verificou-se no flavedo: $PSH > PSO > PSA$; e no albedo: $PSH > PSA > PSO$. Em geral, após a cura houve uma diminuição da hemicelulose no flavedo e albedo, assim como após 30 dias de armazenamento para a hemicelulose e

celulose. Em relação a específicas modificações da parede celular provocadas pela injúria por frio em frutos armazenados a 2°C, somente se pode observar maior diminuição de hemicelulose. Com o tratamento de cura por 3 dias a 37°C houve maior diminuição da textura dos frutos no estágio II do que no III. A firmeza dos frutos também diminuiu, em geral, após 10 dias de armazenamento, principalmente a 12°C.

HIGH TEMPERATURE-INDUCED CELL WALL COMPONENTS CHANGES AND DURING COLD STORAGE OF 'FORTUNE' MANDARINS

SUMMARY

'Fortune' mandarins were harvested at three stages of maturity from adult trees growing in an orchard at Sagunto, Valencia- Spain. The effect of 3 days of heat conditioning (curing) on chilling susceptibility and on cell wall components changes in fruits harvested at the different stages of development and maturation was evaluated. The conditioned and nonconditioned fruits were stored at 90-95% R.H. at either 2°C (chilled) or 12°C (nonchilled control). Flavedo and albedo tissues were sampled before storing the fruits and in fruits stored for 30 days for cell wall components analysis. The levels of total pectin, degree of esterification, pectic fractions, hemicellulose and cellulose were measured. The albedo showed always higher levels of cell wall components or ethanol-insoluble solids (EIS) than the flavedo and, in general, also higher concentrations of total pectin, hemicellulose and cellulose. In fruits harvested at the end of January (maturation stage II), a increase of EIS occurred in heated fruits and after stored for 30 days, when the exocarp of the mandarin fruits had higher amount of reducing sugars and sucrose. The total pectin content also increased in the flavedo and albedo of conditioned fruits harvested at the stages I and II but decrease in those of the stage III. The degree of esterification (D.E.) decreased more in the flavedo than in the albedo during the storage, mainly in the stages II and III. In the more mature fruits (stage III) there was a better relationship between the decrease in pectin insoluble fraction - HSP (HCl-soluble pectin) and the increase in pectin soluble fractions - WSP and OSP, water-soluble fraction and ammonium oxalate-soluble, respectively. In the three stages of maturation and under each treatment, it was observed in the flavedo that: $HSP > OSP > WSP$; whereas in the albedo : $HSP > WSP > OSP$. Conditioning the fruits induced, in general, a decrease of hemicellulose in the flavedo and albedo. The hemicellulose and cellulose was also lowest in the conditioned fruits after 30 days of storage. In relation to specific changes of the cell wall in response to cold stress a higher hemicellulose decrease was observed. Texture decreased after conditioning the fruits for 3 days at 37°C and more in fruits harvested in

the stage II than in the stage III. The firmness of the fruits also decreased, in general, after 10 days storage. Such decline was more noticeable at 12 than at 2°C.

6.1. INTRODUÇÃO

O armazenamento pós-colheita e distribuição de frutos e hortaliças a baixas temperaturas é um método eficiente e muito utilizado para o controle do amadurecimento e deterioração, estendendo-se assim, o tempo de vida útil dos produtos. Porém, muitos frutos e hortaliças são susceptíveis à injúria pelo frio (IF). De acordo com YUEN & TRIDJAJA (1995), a IF é uma desordem fisiológica que ocorre em plantas e seus produtos expostos a baixas temperaturas por um determinado período. As tangerinas 'Fortune' são muito sensíveis a IF, a qual induz a pequenas depressões marrons no flavedo dos frutos.

O uso do tratamento pelo calor em câmaras, também conhecido como "cura", antes do armazenamento refrigerado, tem evitado ou reduzido a incidência da IF em frutos como tomates e maçãs (KLEIN & LURIE, 1992) e inclusive nas tangerinas 'Fortune' (LAFUENTE *et al.*, 1997).

No estágio secundário da IF ocorre um colapso no tecido, o que pode ser um resultado do colapso das paredes celulares (MERCER & SMITTLE, 1992). A parede celular é o principal componente estrutural da célula circundando o protoplasto e exterior ao plasmalema da célula. Cada parede celular interage com suas vizinhas ligando as células para formar vários tipos de tecidos. As paredes de tecidos de crescimento são hidratadas e estão constantemente mudando em respostas ao crescimento, estágio de diferenciação, meio-ambiente das células e as suas atividades (SELVENDRAN & RYDEN, 1990). Os principais constituintes da parede celular de frutos são: pectina, hemicelulose e celulose.

O amolecimento de frutos frescos durante o armazenamento é de interesse econômico, pois é um processo que influencia os danos físicos durante o manuseio, susceptibilidade a doenças, duração do armazenamento e aceitabilidade do consumidor (SIDDIQUI *et al.*, 1996). Os constituintes da parede celular possuem uma importante influência nas mudanças texturiais dos frutos.

Não se tem muito conhecimento das modificações da parede celular do exocarpo dos frutos cítricos durante o armazenamento, principalmente do flavedo e albedo estudados separadamente. Portanto, no presente trabalho, têm-se os objetivos de avaliar as modificações dos componentes da parede celular do flavedo e albedo de três estádios de

maturação das tangerinas 'Fortune' sob armazenamento refrigerado, assim como as modificações provocadas pelo tratamento de cura, e durante o armazenamento dos frutos curados.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1. Material vegetal

Foram realizadas coletas dos frutos em 09/12/96, 27/01/97 e 03/03/97 do pomar em Sagunto, Valência - Espanha. Todos os frutos colhidos nestas respectivas datas, pertencentes a três diferentes estádios de maturação, sofreram os tratamentos de temperatura (cura e/ou armazenamento). Após o transporte de cerca de 1000 tangerinas ao IATA (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos) estas foram selecionadas e homogeneizadas, eliminando-se as que apresentavam injúrias e separadas ao acaso em 3 repetições de 10 frutos para cada tempo da coleta de amostras e para cada tratamento de temperatura. Parte dos frutos foi acondicionada em câmara a 37°C a 90-95% de umidade relativa (UR), por três dias (cura) e posteriormente armazenada em câmaras de 2°C e 12°C a 80-85% UR, por 30 dias. Uma outra parte dos frutos foi armazenada diretamente a 2°C e 12°C. No "ponto zero" e após 30 dias foram colhidas amostras de flavedo e albedo das tangerinas. Os quais foram picados, homogeneizados, acondicionados em embalagens plásticas (PVC), congelados com nitrogênio líquido, armazenados a -80°C, e posteriormente liofilizados.

Para a análise de textura foram separados 30 frutos para cada tratamento nos estádios II e III, sendo que cada 10 frutos constituía uma repetição.

No pomar de Sagunto, as temperaturas mínimas e máximas e umidades relativas médias dos meses de dezembro, janeiro e fevereiro de 1993/94 foram, respectivamente: 4,07, 18,26°C; 3,69, 17,00°C e 5,17, 18,90°C; 61,90%, 54,04% e 52,91%. E em 1996/97 foram, respectivamente: 6,70, 16,86°C; 6,47, 14,95°C e 5,15, 18,87°C; 67,48%, 69,61% e 64,75%.

6.2.2. Delineamento experimental e análises estatísticas

Trata-se de um experimento fatorial completo $2 \times 2 \times 2 \times 2$, utilizando-se blocos casualizados e considerando-se blocos os três estádios de maturação. Os fatores avaliados foram: flavedo/albedo, pré-tratamento (com e sem cura), temperatura (2 e 12°C) e tempos de armazenamento (“ponto 0” e 30 dias). Para o parâmetro textura utilizou-se um experimento fatorial completo $2 \times 2 \times 4$, utilizando-se blocos casualizados e considerando-se blocos os dois estádios de maturação. Os fatores avaliados foram: pré-tratamento (com e sem cura), temperatura (2 e 12°C) e tempos de armazenamento (“ponto 0”, 10, 20 e 30 dias).

Os efeitos principais e os efeitos de interação dos tratamentos foram avaliados através de uma análise da variância (ANOVA) dos resultados experimentais.

Na avaliação de possíveis relações causa-efeito entre os diversos parâmetros estudados foi feita a análise de correlação.

Para a análise dos dados foi utilizado o programa “Statistica versão 5.0”.

6.2.2. Métodos

6.2.2.1. Determinação da textura

Foi realizada com penetrômetro Magness-Taylor com “plunger” de ponta cônica de 0,83 cm de diâmetro, em regiões equatoriais da superfície do fruto, sem eliminar o flavedo. Os resultados obtidos em lb/pol² (libras/polegadas²) foram transformados em Kgf através do fator multiplicativo 0,42.

A extração do material da parede celular ou sólidos insolúveis em etanol (SIE) e as análises de seus constituintes, tais como: pectina total, grau de esterificação da pectina, frações pécticas, hemicelulose e celulose, foram efetuadas conforme descritas no capítulo 5.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1. Material de parede celular ou SIE

Houve efeito significativo ($p < 0,05$) para a variável flavedo/albedo. O albedo contém em todos os tratamentos mais material de parede celular (SIE) do que o flavedo.

Como já foi comentado no capítulo anterior, o conteúdo de SIE diminuiu com a maturação das tangerinas. Nos estádios I, II e III a porcentagem de SIE foi respectivamente, de 34,44%, 29,20% e 24,72% para o flavedo e de 64,28%, 53,80% e 51,17% para o albedo. EAKS & SINCLAIR (1980) reportaram que no exocarpo (flavedo e albedo) de laranjas 'Valencia' também houve diminuição dos SIE de 76,7% em frutos imaturos para 53,0% em frutos maduros. Fazendo-se uma média da soma do teor de SIE do flavedo e albedo das tangerinas 'Fortune', obtêm-se valores de 49,36% e de 37,94% para frutos maduros e imaturos, respectivamente, ou seja, valores menores que os obtidos para o exocarpo de laranjas Valencia. O aumento de sólidos solúveis em etanol durante a maturação, principalmente açúcares redutores e sacarose, provavelmente é a causa principal da diminuição dos SIE.

A variável pré-tratamento (com e sem cura) apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero, isto é, logo depois do tratamento de cura. Após os três dias de cura, pode-se observar na Tabela 1 que o material da parede celular ou (SIE), tanto do albedo quanto do flavedo, aumentaram nos três estádios de maturação, com exceção do estádio I para o albedo. Este fato sugere que houve uma síntese de parede celular. SHALOM *et al.* (1993) acondicionaram maçãs a 38°C por 3 dias e observaram que este tratamento pelo calor elevou a síntese de parede celular durante o armazenamento a 0°C dos frutos, porém não reportaram a síntese de parede celular durante o tratamento pelo calor.

Após 30 dias de armazenamento dos frutos com e sem cura a 2 e 12°C, verifica-se que nem sempre houve uma queda no teor de SIE, ao contrário, em alguns tratamentos parece ter ocorrido síntese da parede celular e portanto, aumento dos SIE. No flavedo houve síntese somente nos frutos armazenados a 12°C em tangerinas não curadas do estádio I de maturação e em tangerinas com e sem cura do estádio II. NAOHARA & MANABE (1994) reportaram um aumento nos SIE do flavedo de tangerinas 'Satsuma'

somente após 80 dias de armazenamento a 5°C. No albedo das tangerinas 'Fortune' houve aumento dos SIE em frutos curados e armazenados a 2°C no estágio I de maturação, em todos os tratamentos do estágio II e nos frutos sem cura a 2 e 12°C do estágio III.

Maturação	Tempo (dias)	Tratamento	SIE (%)	
			F	A
Estádio I (09/12/199)	0	2°C - NC	34,44 (2,92)	64,28 (1,40)
		12°C - NC	34,44 (2,92)	64,28 (1,40)
		2°C - C	37,73 (0,90)	61,65 (2,40)
		12°C - C	37,73 (0,90)	61,65 (2,40)
	30	2°C - NC	33,14 (1,08)	62,76 (1,11)
		12°C - NC	35,45 (0,74)	62,48 (0,02)
		2°C - C	35,59 (1,50)	66,51 (1,26)
		12°C - C	33,41 (0,05)	59,82 (1,70)
Estádio II (27/01/1997)	0	2°C - NC	29,20 (1,49)	53,80 (4,90)
		12°C - NC	29,20 (1,49)	53,80 (4,90)
		2°C - C	29,97 (0,73)	56,26 (0,14)
		12°C - C	29,97 (0,73)	56,26 (0,14)
	30	2°C - NC	28,79 (0,70)	58,46 (0,53)
		12°C - NC	29,51 (2,21)	61,01 (1,01)
		2°C - C	28,15 (0,79)	59,11 (0,04)
		12°C - C	32,23 (0,68)	62,26 (3,56)
Estádio III (03/03/1997)	0	2°C - NC	24,72 (1,85)	51,17 (2,07)
		12°C - NC	24,72 (1,85)	51,17 (2,07)
		2°C - C	28,42 (2,11)	58,14 (4,05)
		12°C - C	28,42 (2,11)	58,14 (4,05)
	30	2°C - NC	22,64 (2,00)	52,00 (0,07)
		12°C - NC	24,01 (0,45)	56,65 (1,48)
		2°C - C	27,93 (0,57)	54,67 (1,74)
		12°C - C	26,64 (0,67)	51,09(2,09)

Tabela 1: Teor de sólidos insolúveis em etanol (SIE-%) do flavedo (F) e albedo (A), e seus respectivos desvios padrões, de tangerinas 'Fortune' em três estádios de maturação, a 0 e 30 dias de armazenamento a 2 e 12°C de frutos com (C) e sem cura (NC).

Não foi o caso, mas se a interação entre estágio de maturação e tempo de armazenamento tivesse apresentado efeito significativo ($p < 0,05$), poder-se-ia dar maior importância a um mais elevado aumento dos SIE no estágio II de maturação, estágio este que apresentou o maior teor de sacarose, glicose e frutose, respectivamente, com valores de 12,26, 23,25 e 23,61 mg/g de flavedo, em comparação com o estágio I (8,85, 11,53 e 11,59 mg/g de flavedo) e estágio III (11,60, 19,95 e 19,21 mg/g flavedo).

De acordo com HANDA *et al.* (1982) as culturas de células de tomate adaptadas ao estresse por água induzido pelo polietilenoglicol acumulam substanciais quantidades de açúcares e aminoácidos, mas estes são utilizados na síntese de polissacarídeos da parede celular.

No flavedo de frutos com e sem cura armazenados a 2°C não houve aumento ou síntese de SIE em nenhum estágio de maturação. Este fato sugere um direcionamento dos açúcares para a proteção das membranas quando o fruto está sob temperatura de estresse (2°C), uma vez que o flavedo dos frutos cítricos é o tecido mais susceptível à injúria pelo frio.

6.3.2. Pectina total e grau de esterificação

Durante a maturação das tangerinas houve um crescente aumento da pectina total do flavedo. No albedo, porém, o estágio III apresentou uma quantidade de pectina total um pouco menor que o estágio II, possivelmente devido a sua solubilização e ou degradação.

Houve efeito significativo ($p < 0,05$) para as variáveis flavedo/albedo e pré-tratamento (com e sem cura). Inicialmente (“ponto zero”) e após 30 dias de armazenamento, com exceção dos frutos não curados do estágio I de maturação, o teor de pectina total foi maior no albedo do que no flavedo em todos os tratamentos. Na Tabela 2 verifica-se que com o tratamento de cura houve aumento em pectina total nos estádios I e II de maturação e diminuição no estágio III, o que já pode ser resultado do processo de amadurecimento. As substâncias pécticas, hemicelulose e celulose sofrem uma despolimerização no amadurecimento de frutos, e dessa maneira contribuem significativamente para o amolecimento do tecido (PROCTOR & PENG, 1989). O

aumento em pectina total sugere síntese de pectina com a cura dos frutos, o que não impede de ao mesmo tempo ter ocorrido uma solubilização da pectina.

A variável tempo de armazenamento (“ponto 0” e 30 dias) e a interação entre estágio de maturação x tempo de armazenamento apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) pelo teste F. De maneira geral, o nível de pectina total elevou-se durante o armazenamento das tangerinas, principalmente durante os estádios I e II de maturação, o que pode estar relacionado com o aumento de SIE nos respectivos estádios. Houve uma correlação significativa ($p < 0,05$) entre os SIE e pectina total no estágio II de maturação com $r = 0,78$. REDGWELL (1996) reportou em um estudo pós-colheita de frutos kiwi, que a síntese de parede celular que ocorre nos frutos íntegros, provavelmente reflete uma sobra de algum processo constitutivo que foi mais ativo na fase inicial do desenvolvimento do fruto.

Alguns estudos têm indicado que durante o processo de amadurecimento, além de degradações também ocorrem sínteses da parede celular. MITCHAM *et al.* (1989) verificaram uma síntese de fração péctica, hemicelulósica e celulósica na parede de tomates durante as fases de desenvolvimento e amadurecimento. De acordo com estes autores, a síntese e inserção de um modificado polímero com remoção de outros polímeros pode produzir uma parede celular menos rígida e permitir o amolecimento do tecido durante o amadurecimento. Porém, REDGWELL (1996) concluiu em um estudo com kiwi que embora os frutos maduros e amadurecidos sejam capazes de sintetizar polímeros da parede celular durante o amadurecimento, isto não parece estar relacionado com o processo de amolecimento.

Não tem sido relatado que o tratamento pelo calor tenha inibido a síntese de SIE, ao contrário, KAGAN-ZUR *et al.* (1995) reportaram que a expressão de genes da poligalacturonase em tomates foi gradualmente e irreversivelmente eliminada durante o estresse pelo calor, enquanto a expressão de genes da pectinametilesterase foi muito menos sensível ao calor. Segundo SHALOM *et al.* (1993) o aumento no teor de ácidos urônicos em maçãs que sofreram tratamento térmico foi porque este inibe o processo de degradação sem afetar a síntese.

Maturação	Tempo (dias)	Tratamento	Pectina Total (mg/g)		GE (%)	
			F	A	F	A
Estádio I (09/12/199)	0	2°C - NC	252,37 (7,30)	318,70 (5,98)	6,66 (2,06)	34,52 (7,96)
		12°C - NC	252,37 (7,30)	318,70 (5,98)	6,66 (2,06)	34,52 (7,96)
		2°C - C	362,84 (13,21)	372,09 (33,91)	28,25 (0,54)	41,79 (4,46)
		12°C - C	362,84 (13,21)	372,09 (33,91)	28,25 (0,54)	41,79 (4,46)
	30	2°C - NC	372,12 (9,52)	351,66 (2,29)	40,58 (0,78)	26,34 (1,58)
		12°C - NC	381,43 (19,03)	348,11 (10,46)	32,97 (3,03)	37,02 (3,78)
		2°C - C	398,64 (18,14)	422,91 (18,44)	38,16 (6,87)	45,54 (1,18)
		12°C - C	379,23 (4,30)	413,71 (6,04)	23,98 (4,17)	41,24 (3,96)
Estádio II (27/01/1997)	0	2°C - NC	354,95 (7,59)	421,80 (7,66)	45,07 (0,57)	36,74 (1,78)
		12°C - NC	354,95 (7,59)	421,80 (7,66)	45,07 (0,57)	36,74 (1,78)
		2°C - C	390,08 (8,23)	489,81 (4,41)	25,00 (0,00)	36,04 (1,69)
		12°C - C	390,08 (8,23)	489,81 (4,41)	25,00 (0,00)	36,04 (1,69)
	30	2°C - NC	356,87 (8,25)	432,53 (4,63)	24,16 (0,84)	44,18 (3,47)
		12°C - NC	374,88 (8,47)	438,60 (27,40)	25,00 (0,00)	41,83 (2,40)
		2°C - C	416,01 (0,54)	480,80 (20,65)	21,57 (3,43)	37,09 (1,92)
		12°C - C	435,83 (19,73)	507,27 (20,42)	23,19 (1,81)	40,94 (5,02)
Estádio III (03/03/1997)	0	2°C - NC	361,17 (13,67)	388,47 (1,75)	36,11 (0,72)	27,43 (2,48)
		12°C - NC	361,17 (13,67)	388,47 (1,75)	36,11 (0,72)	27,43 (2,48)
		2°C - C	328,38 (5,35)	348,31 (3,15)	28,15 (1,39)	18,20 (0,64)
		12°C - C	328,38 (5,35)	348,31 (3,15)	28,15 (1,39)	18,20 (0,64)
	30	2°C - NC	409,43 (1,94)	468,21 (12,28)	31,79 (0,18)	40,33 (5,37)
		12°C - NC	335,64 (6,78)	348,11 (24,39)	29,88 (2,08)	21,17 (4,94)
		2°C - C	325,34 (0,61)	344,39 (6,98)	21,64 (1,53)	25,77 (5,39)
		12°C - C	314,13 (14,42)	381,33 (31,09)	16,54 (4,02)	29,48 (2,52)

Tabela 2: Teor de pectina total (mg/g), grau de esterificação (GE-%), e seus respectivos desvios padrões, do flavedo (F) e albedo (A) de tangerinas 'Fortune' em três estádios de maturação, a 0 e 30 dias de armazenamento a 2 e 12°C de frutos com (C) e sem cura (NC).

As unidades de ácidos urônicos das pectinas são metilesterificadas durante a síntese. De acordo com KIM & CARPITA (1992), a esterificação elimina a carga elétrica e com isso o sítio de ligação para o cálcio.

Pela Tabela 2 pode-se observar nos “pontos zero” (logo após a coleta dos frutos) que durante a maturação das tangerinas o grau de esterificação (GE) no flavedo apresentou um elevado aumento do estágio I para o II e uma redução no estágio III. No albedo houve um pequeno aumento do estágio I para o II e uma diminuição no estágio III, sendo que nos dois últimos estádios a porcentagem do GE foi maior no flavedo.

A variável pré-tratamento (com e sem cura) e a interação entre estágio de maturação x pré-tratamento apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$). Com o tratamento de cura houve aumento do GE no flavedo e albedo no estágio I de maturação e diminuição nos estádios II e III.

Não houve efeito significativo para a variável tempo de armazenamento (0 e 30 dias), mas de uma maneira geral, no albedo o GE aumentou com os tratamentos utilizados nos três estádios de maturação. LURIE *et al.* (1994) reportaram que o aumento do GE em nectarinas durante o amadurecimento, pode ser devido a uma clivagem seletiva de ácido urônico de áreas não esterificadas deixando os polímeros que permaneceram com um mais alto GE. Esta também pode ser uma justificativa para o freqüente aumento do GE no albedo durante o armazenamento, associada a baixa atividade da PME. No flavedo, entretanto verificou-se um aumento no estágio I de maturação e uma diminuição nos estádios II e III. Ou seja, nestes dois últimos estádios no flavedo parece ter ocorrido uma ativação da enzima pectinametilesterase (PME), a qual facilita a despolimerização de pectinas pela poligalacturonase.

6.3.3. Frações pécticas

As modificações nas proporções das frações de ácidos pectínicos, ácidos pécticos e protopectina da parede celular dos frutos ocorrem de maneira variada nos diferentes estádios de maturação e tratamentos pós-colheita aos quais os frutos são submetidos.

Durante a maturação das tangerinas da cultivar Fortune, pode-se observar pelas Tabelas 3, 4 e 5, que as frações pécticas solúvel em água - PSA (ácidos pectínicos), solúvel em oxalato de amônia - PSO (ácido péctico) e solúvel em HCl - PSH

(protopectina ou pectina insolúvel) apresentaram o mesmo comportamento, isto é, aumentaram do estágio I para o II e diminuíram no estágio III. Esse declínio no último estágio foi menor na PSA (7,52% e 1,75% no flavedo e albedo, respectivamente) do que na PSO (16,56% e 4,88%) e nesta foi menor do que na PSH (23,25% e 25,74%).

Maturação	Tempo (dias)	Tratamento	PSH (mg/g)	
			F	A
Estádio I (09/12/199)	0	2°C -NC	75,49 (1,65)	123,49 (7,17)
		12°C -NC	75,49 (1,65)	123,49 (7,17)
		2°C - C	168,02 (8,03)	191,63 (10,71)
		12°C - C	168,02 (8,03)	191,63 (10,71)
	30	2°C - NC	120,56 (7,31)	124,34 (4,16)
		12°C - NC	136,13 (6,22)	156,37 (15,23)
		2°C - C	144,10 (3,16)	153,40 (7,08)
		12°C - C	125,08 (1,30)	145,89 (5,42)
Estádio II (27/01/1997)	0	2°C - NC	173,87 (8,23)	205,75 (1,88)
		12°C - NC	173,87 (8,23)	205,75 (1,88)
		2°C - C	105,60 (7,07)	136,20 (3,31)
		12°C - C	105,60 (7,07)	136,20 (3,31)
	30	2°C - NC	149,74 (29,93)	135,17 (6,98)
		12°C - NC	202,08 (3,67)	210,12 (0,59)
		2°C - C	173,37 (3,53)	188,32 (36,25)
		12°C - C	202,31 (11,01)	216,51 (19,07)
Estádio III (03/03/1997)	0	2°C - NC	133,45 (11,16)	152,79 (17,83)
		12°C - NC	133,45 (11,16)	152,79 (17,83)
		2°C - C	163,38 (11,99)	135,83 (14,27)
		12°C - C	163,38 (11,99)	135,83 (14,27)
	30	2°C - NC	121,64 (0,64)	154,30 (0,35)
		12°C - NC	124,80 (9,41)	157,70 (6,20)
		2°C - C	93,84 (2,55)	144,45 (2,28)
		12°C - C	133,60 (1,77)	116,93 (15,86)

Tabela 3: Teor de pectina solúvel em ácido (PSH-mg/g) do flavedo e albedo, e seus respectivos desvios padrões, de tangerinas 'Fortune' em três estádios de maturação, a 0 e 30 dias de armazenamento a 2 e 12°C de frutos com (C) e sem cura (NC).

Não houve efeito significativo ($p < 0,05$) pelo teste F para a variável pré-tratamento (com e sem cura), porém a interação entre estágio de maturação x pré-tratamento apresentou efeito significativo ($p < 0,05$). Em geral, com o tratamento de cura as três frações no flavedo e albedo aumentaram no estágio I de maturação, diminuíram no estágio II e apresentaram uma pequena diminuição no estágio III, com exceção da PSH que aumentou no flavedo. O comportamento paralelo das três frações em cada estágio não está de acordo com o que ocorre em outros frutos, onde em geral, ocorre a diminuição da PSH e o aumento da PSA, como em pêssegos (SHEWFELT *et al.*, 1971) e em tomates (MALIS-ARAD *et al.*, 1983). A queda das frações no estágio II também é contraditório ao aumento da pectina total com o tratamento de cura, a não ser que outros solventes, além dos três utilizados para solubilizar as frações pécticas, sejam mais indicados para identificar um aumento de pectina total. NAOHARA & MANABE (1994) utilizaram hidróxido de sódio 0,05 N e BEN-ARIE *et al.* (1996) o ácido trans-1,2-diaminociclohexano-N, N, N', N' tetracético (CDTA), um quelante como o oxalato de amônia.

Em todos os tratamentos dos três estádios de maturação, no flavedo as frações se apresentaram da seguinte maneira: PSH > PSO > PSA; e no albedo: PSH > PSA > PSO. Somente após 30 dias de armazenamento, no albedo dos frutos curados e armazenados a 12°C, é que o conteúdo da PSA esteve maior ao da PSH.

Verifica-se nas Tabelas 3, 4 e 5 que após os 30 dias de armazenamento, no estágio I de maturação, houve diminuição da fração insolúvel (PSH) nos frutos curados e armazenados a 2 e 12°C e aumento da PSH nos frutos não curados, tanto no flavedo quanto no albedo. As frações PSA e PSO, em conjunto ou separadamente, apresentaram um comportamento inverso a PSH, com exceção do flavedo dos frutos sem cura a 2 e 12°C. Em geral, no estágio II as três frações se apresentaram da mesma maneira, com um aumento no flavedo e albedo dos frutos curados e armazenados a 2 e 12°C e uma diminuição no albedo das tangerinas sem cura e armazenadas a 2 e 12°C e no flavedo a 2°C. No estágio III o comportamento inverso, em conjunto ou separadamente, das frações PSA e PSO ao da PSH foi mais evidente. Houve uma queda da PSH no flavedo em todos os tratamentos e no albedo dos frutos sem cura e armazenados a 12°C. NAOHARA &

MANABE (1994) também observaram uma maior diminuição da PSH no flavedo do que no albedo durante o armazenamento de tangerinas ‘Satsuma’.

Maturação	Tempo (dias)	Tratamento	PSA (mg/g)	
			F	A
Estádio I (09/12/199)	0	2°C - NC	19,91 (0,37)	103,07 (2,62)
		12°C - NC	19,91 (0,37)	103,07 (2,62)
		2°C - C	48,37 (3,42)	102,12 (11,26)
		12°C - C	48,37 (3,42)	102,12 (11,26)
	30	2°C - NC	34,14 (4,94)	83,55 (2,39)
		12°C - NC	35,29 (0,84)	105,18 (14,98)
		2°C - C	43,59 (3,79)	110,35 (6,99)
		12°C - C	38,67 (0,80)	128,02 (4,30)
Estádio II (27/01/1997)	0	2°C - NC	50,52 (0,83)	128,74 (15,06)
		12°C - NC	50,52 (0,83)	128,74 (15,06)
		2°C - C	35,54 (3,79)	99,09 (4,26)
		12°C - C	35,54 (3,79)	99,09 (4,26)
	30	2°C - NC	40,27 (3,73)	85,88 (5,54)
		12°C - NC	54,70 (4,69)	110,14 (12,12)
		2°C - C	48,07 (5,29)	132,74 (7,90)
		12°C - C	52,20 (0,58)	146,79 (2,29)
Estádio III (03/03/1997)	0	2°C - NC	46,72 (2,49)	126,48 (3,14)
		12°C - NC	46,72 (2,49)	126,48 (3,14)
		2°C - C	46,12 (5,44)	113,85 (11,76)
		12°C - C	46,12 (5,44)	113,85 (11,76)
	30	2°C - NC	61,77 (9,87)	129,34 (8,34)
		12°C - NC	54,53 (5,24)	136,66 (14,54)
		2°C - C	38,54 (2,07)	106,02 (6,09)
		12°C - C	50,48 (7,97)	128,14 (7,74)

Tabela 4: Teor de pectina solúvel em água (PSA-mg/g) do flavedo e albedo, e seus respectivos desvios padrões, de tangerinas ‘Fortune’ em três estádios de maturação, a 0 e 30 dias de armazenamento a 2 e 12°C de frutos com (C) e sem cura (NC).

Maturação	Tempo (dias)	Tratamento	PSO (mg/g)	
			F	A
Estádio I (09/12/199)	0	2°C - NC	25,58 (2,42)	82,75 (26,72)
		12°C - NC	25,58 (2,42)	82,75 (26,72)
		2°C - C	124,34 (5,74)	98,44 (10,88)
		12°C - C	124,34 (5,74)	98,44 (10,88)
	30	2°C - NC	102,44 (3,45)	87,25 (1,59)
		12°C - NC	115,15 (6,33)	71,61 (2,42)
		2°C - C	178,48 (12,77)	155,57 (6,66)
		12°C - C	228,77 (6,03)	164,24 (14,43)
Estádio II (27/01/1997)	0	2°C - NC	130,33 (3,89)	114,42 (3,03)
		12°C - NC	130,33 (3,89)	114,42 (3,03)
		2°C - C	104,12 (1,40)	78,09 (3,93)
		12°C - C	104,12 (1,40)	78,09 (3,93)
	30	2°C - NC	116,09 (20,46)	77,08 (4,26)
		12°C - NC	140,14 (15,32)	101,46 (3,61)
		2°C - C	111,43 (5,10)	104,33 (10,67)
		12°C - C	125,49 (7,69)	121,65 (0,62)
Estádio III (03/03/1997)	0	2°C - NC	108,75 (2,02)	108,83 (7,94)
		12°C - NC	108,75 (2,02)	108,83 (7,94)
		2°C - C	99,17 (0,54)	100,20 (11,11)
		12°C - C	99,17 (0,54)	100,20 (11,11)
	30	2°C - NC	108,16 (9,05)	84,39 (4,36)
		12°C - NC	115,11 (10,35)	102,08 (10,62)
		2°C - C	80,99 (4,68)	66,80 (8,94)
		12°C - C	104,27 (15,55)	67,84 (2,04)

Tabela 5: Teor de pectina solúvel em oxalato de amônia (PSO-mg/g) do flavedo e albedo, e seus respectivos desvios padrões, de tangerinas 'Fortune' em três estádios de maturação, a 0 e 30 dias de armazenamento a 2 e 12°C de frutos com (C) e sem cura (NC).

Os resultados obtidos sugerem que no estágio III, quando os frutos estão mais maduros, é onde se tem uma melhor relação entre uma diminuição da PSH e um aumento das frações conhecidas como solúveis, principalmente da PSA. A despolimerização e maior solubilidade da pectina durante o amadurecimento leva a um amolecimento do tecido, porém segundo HUBER (1984), os níveis e atividades das enzimas que degradam os polímeros das paredes celulares no amadurecimento dos frutos não estão sempre de acordo com a taxa de amolecimento destes. NAOHARA & MANABE (1993) verificaram uma pequena atividade da poligalacturonase (PG) em tangerinas 'Satsuma' maduras, porém identificou-se claramente a atividade da PG nos frutos armazenados a baixa temperatura por um longo período. A PG e a PE aparentemente induzem a uma diminuição na PSH e um aumento na PSA durante o armazenamento a frio. Entretanto, de acordo com (NAOHARA & MANABE, 1994) não se sabe se as diferenças nas taxas de despolimerização de pectinas solúveis foram causadas por diferentes pectinases ou diferentes composições de açúcares neutros. SIDDIQUI *et al.* (1996) verificaram ligeiras diferenças no tamanho molecular de frações pécicas de maçãs durante o armazenamento, e portanto, sugeriram que a solubilização da pectina pode resultar da clivagem enzimática de ligações entre pectinas e outros componentes da parede celular melhor do que da degradação de cadeias pécicas.

6.3.4. Hemicelulose e celulose

Além da pectina, as modificações em outros polímeros da parede celular como hemicelulose e celulose também podem contribuir nas mudanças de textura dos frutos.

Houve efeito significativo ($p < 0,05$) para a variável flavedo/albedo e na interação desta com estágio de maturação para o parâmetro hemicelulose. O flavedo das tangerinas 'Fortune' apresentou um aumento crescente de hemicelulose no "ponto zero" dos três estádios de maturação, enquanto no albedo houve um aumento do estágio I para o II e uma diminuição no estágio III, sendo que somente neste estágio o teor de hemicelulose foi menor do que no flavedo (Tabela 3). CUTILLAS-ITURRALDE *et al.* (1993) estudaram o crescimento de caquis e verificaram que a média da massa molecular de hemicelulose e xiloglucana aumenta da expansão inicial para a fase estacionária de crescimento. A massa

molecular de hemicelulose e xiloglucana então, diminui com o amadurecimento, após o fruto ter mudado de cor e a firmeza ter diminuído acentuadamente.

As variáveis pré-tratamento (com e sem cura) e tempo de armazenamento (0 e 30 dias), assim como a interação entre ambas apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$). Em geral, após os três dias do tratamento de cura houve uma diminuição no nível de hemicelulose no flavedo e albedo dos frutos, ocorrendo o mesmo após os 30 dias de armazenamento, com exceção do albedo de frutos curados e armazenados a 12°C no estágio II e III de maturação.

O exocarpo dos frutos cítricos, inclusive das tangerinas 'Fortune', não sofrem um amaciamento como os frutos de polpa, como por exemplo os caquis e tomates. Mas, apesar de serem menos perceptíveis também ocorrem mudanças texturiais no flavedo e albedo dos frutos cítricos. E, de acordo com os resultados obtidos com a determinação da hemicelulose, pode-se concluir que a sua estrutura foi susceptível ao tratamento pelo calor e aos 30 dias de armazenamento a 2 e 12°C nos três estádios de maturação. Portanto, pode haver uma relação destas alterações no teor de hemicelulose com as modificações na textura das tangerinas.

Em relação as alterações ocorridas no nível de celulose, estas foram bem menores às da hemicelulose. Para a característica celulose houve efeito significativo ($p < 0,05$) pelo teste F nas variáveis flavedo/albedo e tempo de armazenamento (0 e 30 dias). Nos três estádios de maturação e em todos os "pontos zero" dos tratamentos, o teor de celulose foi mais alto no albedo do que no flavedo.

Na Tabela 3, observa-se que com o tratamento de cura houve um ligeiro aumento do nível de celulose no estágio I de maturação, uma pequena diminuição no estágio II e no estágio III um pequeno aumento no flavedo e queda no albedo, portanto, a variável pré-tratamento não teve efeito significativo ($p < 0,05$).

Maturação	Tempo (dias)	Tratamento	Hemicelulose (mg/g)		Celulose (mg/g)	
			F	A	F	A
Estádio I (09/12/199)	0	2°C - NC	146,74 (10,85)	179,55 (3,58)	202,21 (12,44)	227,63 (3,02)
		12°C - NC	146,74 (10,85)	179,55 (3,58)	202,21 (12,44)	227,63 (3,02)
		2°C - C	136,54 (10,00)	175,81 (8,12)	206,95 (0,64)	228,00 (6,20)
		12°C - C	136,54 (10,00)	175,81 (8,12)	206,95 (0,64)	228,00 (6,20)
	30	2°C - NC	125,47 (7,34)	154,43 (6,57)	191,21 (5,51)	223,08 (3,59)
		12°C - NC	140,21 (15,45)	174,14 (15,64)	211,08 (11,33)	207,18 (16,72)
		2°C - C	126,25 (9,84)	164,84 (3,92)	182,25 (0,82)	215,99 (3,83)
		12°C - C	123,39 (2,52)	162,78 (2,11)	190,90 (4,03)	209,35 (4,43)
Estádio II (27/01/1997)	0	2°C - NC	170,54 (11,26)	220,18 (38,26)	212,85 (9,49)	239,78 (0,20)
		12°C - NC	170,54 (11,26)	220,18 (38,26)	212,85 (9,49)	239,78 (0,20)
		2°C - C	153,86 (7,41)	163,82 (5,24)	191,70 (5,65)	227,56 (11,45)
		12°C - C	153,86 (7,41)	163,82 (5,24)	191,70 (5,65)	227,56 (11,45)
	30	2°C - NC	122,15 (15,26)	152,64 (5,26)	190,74 (10,73)	230,53 (8,03)
		12°C - NC	130,94 (10,17)	148,49 (7,19)	180,63 (4,88)	210,95 (5,97)
		2°C - C	140,11 (2,58)	161,42 (4,05)	202,13 (4,03)	203,96 (7,89)
		12°C - C	127,63 (4,33)	165,99 (3,09)	176,74 (16,69)	221,30 (1,30)
Estádio III (03/03/1997)	0	2°C - NC	220,28 (13,32)	156,68 (9,22)	199,92 (8,75)	237,10 (5,23)
		12°C - NC	220,28 (13,32)	156,68 (9,22)	199,92 (8,75)	237,10 (5,23)
		2°C - C	192,78 (20,56)	157,28 (15,60)	210,82 (8,12)	221,41 (25,66)
		12°C - C	192,78 (20,56)	157,28 (15,60)	210,82 (8,12)	221,41 (25,66)
	30	2°C - NC	160,87 (15,77)	158,97 (6,93)	200,92 (3,97)	247,00 (2,40)
		12°C - NC	142,91 (4,48)	157,16 (10,97)	219,51 (3,82)	209,57 (23,49)
		2°C - C	186,12 (15,39)	137,61 (5,63)	203,98 (0,01)	191,69 (7,93)
		12°C - C	138,64 (3,98)	162,46 (8,75)	230,19 (1,51)	226,77 (26,09)

Tabela 6: Teor de hemicelulose (mg/g) e celulose (mg/g) do flavedo e albedo, e seus respectivos desvios padrões, de tangerinas 'Fortune' em três estádios de maturação, a 0 e 30 dias de armazenamento a 2 e 12°C de frutos com (C) e sem cura (NC).

De maneira geral, predominou uma queda de celulose durante o armazenamento por 30 dias a 2 e 12°C dos frutos com e sem cura, sendo que a variável tempo de armazenamento apresentou efeito significativo ($p < 0,05$). Porém, principalmente no estágio III de maturação, houve um aumento de celulose em alguns tratamentos, como no flavedo de frutos curados e não-curados armazenados a 12°C e no albedo de frutos sem cura a 2°C e de frutos curados e armazenados a 12°C, sugerindo uma síntese de celulose.

Através da visualização direta das ligações cruzadas da parede celular, McCANN *et al.* (1990) interpretaram que as hemiceluloses são responsáveis por manter microfibrilas de celulose em uma posição fixa na matriz da parede celular. SIDDIQUI *et al.* (1996), os quais não observaram a solubilização de celulose durante o armazenamento de maçãs, reportaram que pode ter ocorrido a perda da organização fibrilar da celulose devido a degradação da matriz não-celulósica. Nas tangerinas este fato pode ter ocorrido, além de uma pequena solubilização da celulose em alguns tratamentos.

Durante o armazenamento das tangerinas 'Fortune' verificou-se em alguns tratamentos a síntese da fração péctica insolúvel, celulose e em menor incidência da hemicelulose, o que provavelmente resultou no aumento de SIE.

MERCER & SMITTLE (1992) reportaram a solubilização de polissacarídeos, tais como de frações pécticas e de celulose, e um aumento de hemicelulose em pepinos com injúrias por frio. E de acordo com GRANT *et al.* (1992) o desenvolvimento da injúria por frio em caquis envolve um maior grau de solubilização de material da parede celular, bem como a liberação de poliuronídeos de grande massa molecular com maiores quantidades de açúcares neutros, e uma maior perda de polímeros hemicelulósicos em comparação a frutos não injuriados. Porém, no presente trabalho, em relação às modificações específicas dos constituintes da parede celular de frutos injuriados, ou seja, frutos não curados e armazenados a 2°C por 30 dias, somente se pôde observar uma maior diminuição de hemicelulose.

6.3.5. Textura

Houve efeito significativo ($p < 0,05$) pelo teste F para as variáveis estágio de maturação, pré-tratamento (com e sem cura) e tempo de armazenamento (0, 10, 20 e 30), assim como para as interações entre estas variáveis. Através da Figura 1 observa-se que

durante a maturação dos frutos, do estágio II para o III, houve uma diminuição do valor da textura de 1,44 para 1,24 Kgf, ou seja, ocorreu um amolecimento do exocarpo das tangerinas 'Fortune'.

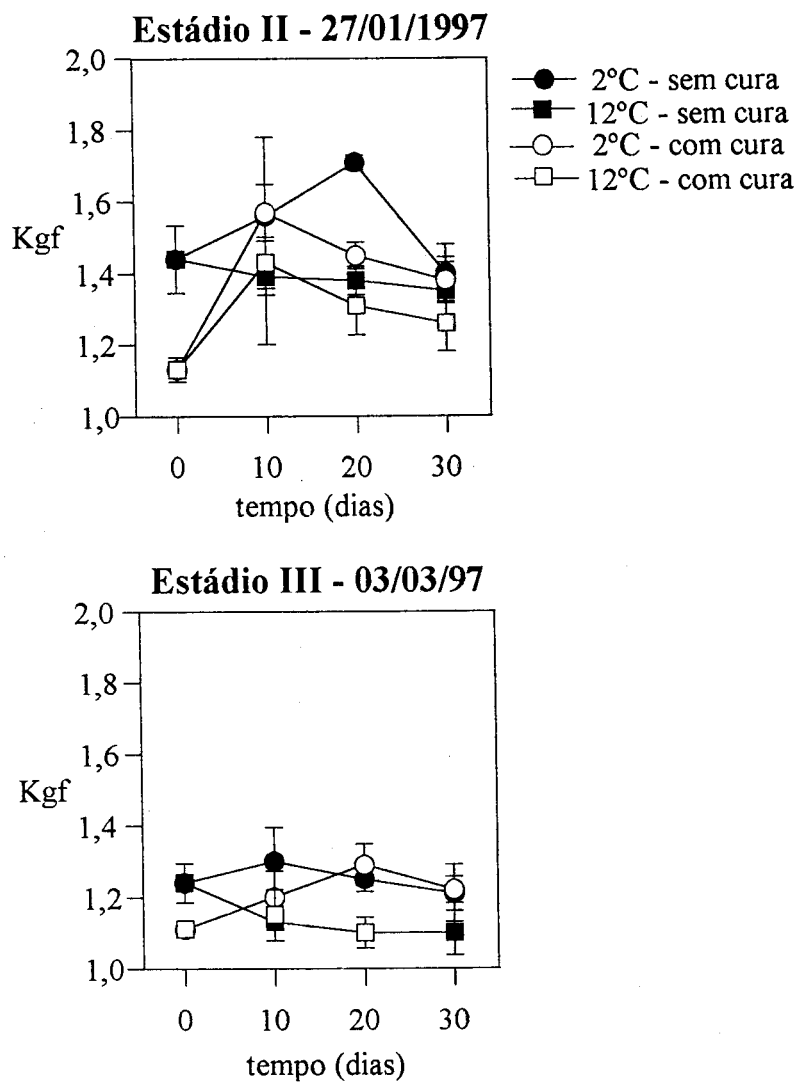


Figura 1: Avaliação da textura (Kgf) de tangerinas 'Fortune' durante o armazenamento refrigerado de frutos com e sem cura.

Inicialmente (“tempo zero” de todos os tratamentos), os frutos curados apresentaram um menor valor para a textura. A diferença na textura após o tratamento de cura foi maior no estágio II de maturação do que no estágio III. De acordo com HEYES & SEALEY (1996), a perda de água pós-colheita possui maior importância na mudança textural em frutos imaturos do que em frutos maduros. Com a cura dos frutos foi identificada uma diminuição da pectina total somente no estágio III e uma diminuição da hemicelulose nos dois estágios, portanto é possível que a perda de água tenha sido o fator de maior influência na textura.

Após os 10 dias de armazenamento, de uma maneira geral, o valor da textura diminuiu para todos os tratamentos, principalmente para os frutos armazenados a 12°C. A variável temperatura (2 e 12°C) e a interação entre tempo de armazenamento e temperatura apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) pelo teste F. Isto indica que o amolecimento textural é reduzido a baixas temperaturas de armazenamento, o que pode ser devido a várias razões, entre elas a redução na taxa de respiração e inibição de enzimas hidrolíticas da parede celular.

Durante o armazenamento dos frutos houve um aumento inicial da textura dos frutos, principalmente para os frutos curados e armazenados a 2°C. Talvez este fato possa ser explicado por modelos celulares estudados por PITT & CHEN (1983) *apud* HEYS & SEALEY (1996). Estes predizem que a diminuição do turgor da célula causaria um aumento no estresse e força requerida para causar o colapso do tecido durante o teste de compressão. Sob condições de alto turgor a parede celular é estirada em um estado de tensão; se a tensão é reduzida torna-se necessário uma maior pressão externa para causar o colapso da parede celular. SHALOM *et al.* (1993) reportaram que o tratamento pelo calor (38°C/4 dias) levou a um aumento na retenção da firmeza de maçãs durante e após o armazenamento. Os autores sugeriram que a perda de açúcares neutros das cadeias laterais durante o tratamento pelo calor pode levar a um mais estreito alinhamento do cordão de pectina retardando a clivagem enzimática.

Apesar da perda de turgor inicial provocada pela perda de água, o tratamento de cura eficiente para evitar as injúrias por frio, parece não prejudicar a qualidade das tangerinas sob o ponto de vista textural durante o armazenamento a 2°C.

6.4. CONCLUSÕES

De maneira geral, o albedo apresentou maior teor de material de parede celular ou SIE e de pectina total, hemicelulose e celulose em todos os tratamentos. Parece ter ocorrido uma síntese de SIE com o tratamento de cura e após 30 dias de armazenamento em muitos tratamentos.

Com a cura e 30 dias de armazenamento houve aumento no flavedo e albedo de pectina total nos estádios I e II de maturação e uma diminuição no estágio III, assim como uma diminuição da hemicelulose nos três estádios e para a celulose após o armazenamento.

O flavedo apresentou menor grau de esterificação (GE) do que o albedo nos estádios II e III durante o armazenamento.

No estágio III, onde os frutos estão mais maduros, houve uma melhor relação entre a diminuição da fração PSH (pectina solúvel em ácido ou pectina insolúvel) e um aumento das frações PSA (pectina solúvel em água) e PSO (pectina solúvel em oxalato de amônia).

Houve uma diminuição da textura com a maturação, tratamento de cura e armazenamento dos frutos, principalmente a 12°C.

Em relação a específicas modificações nos constituintes da parede celular provocadas por injúrias pelo frio em frutos armazenados a 2°C, somente se pôde observar maior diminuição da hemicelulose.

6.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. BEN-ARIE, R.; SAKS, Y.; SONEGO, L.; FRANK, A. Cell wall metabolism in gibberellin-treated persimmon fruits. **Plant Growth Regulation**, v.19, p.25-33, 1996.
02. CUTILLAS-ITURRALDE, A; ZARRA, I.; LORENCES, E. P. Metabolism of cell wall polysaccharides from persimmon fruit. Pectin solubilization occurs in apparent absence of polygalacturonase activity. **Physiologia Plantarum**, v.89, p.369-375, 1993.
03. EAKS, I. L.; SINCLAIR, W. B. Cellulose-hemicellulose fractions in the alcohol-insoluble solids of Valencia orange peel. **Journal of Food Science**, v.45, p.985-988, 1980.

04. GRANT, T. M.; MACRAE, E. A; REDGWELL, R. J. Effect of chilling injury on physicochemical properties of persimmon cell walls. **Phytochemistry**, v.31, n.11, p.3739-3744, 1992.
05. HANDA, A K.; BRESSAN, R. A; HASEGAWA, P. M. Characteristics of cultured tomato cells after prolonged exposure to medium containing polyethylene glycol. **Plant Physiology**, v.69, p.514-521, 1982.
06. HEYES, J. A; SEALEY, D. F. Textural changes during nectarine (*Prunus persica*) development and ripening. **Scientia Horticulturae**, v.65, p.49-58, 1996.
07. HUBER, D. J. Strawberry fruit softening: the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. **Journal of Food Science**, v.49, p.1310-1315, 1984.
08. KAGAN-ZUR, V.; TIEMAN, D. M.; MARLOW, S. J.; HANDA, A K. Differential regulation of polygalacturonase and pectin methylesterase gene expression during and after heat stress in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits. **Plant Molecular Biology**, v.29, p.1101-1110, 1995.
09. KIM, J-B; CARPITA, N. C. Changes in esterification of the uronic acid groups of cell wall polysaccharides during elongation of maize coleoptiles. **Plant Physiology**, v.98, p.646-653, 1992.
10. KLEIN, J. D.; LURIE, S. Heat treatments for improved postharvest quality of horticultural crops. **HortTechnology**, v.2, p.316-320, 1992.
11. LAFUENTE, M. T.; MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. A; ZACARÍAS, L. Absciscic acid in the response of 'Fortune' mandarins to chilling. Effect of maturity and high-temperature conditioning. **Journal Science of Food Agricultural**, v.73, p.494-502, 1997.
12. LURIE, S.; LEVIN, A; GREVE, L. C.; LABAVITCH, J. M. Pectic polymer changes in nectarines during normal and abnormal ripening. **Phytochemistry**, v.36, n.1, p.11-17, 1994.
13. MALIS-ARAD, S.; DIDI, S.; MIZRAHI, Y. Pectic substances: changes in soft and firm tomato cultivars and in non-ripening mutants. **Journal of Horticultural Science**, v.58, n.1, p.111-116, 1983.
14. McCANN, M. C.; WELLS, B.; ROBERTS, K. Direct visualisation of cross-links in the primary cell wall. **Journal Cell Science**, v.96, p.323-334, 1990.
15. MERCER, M. D.; SMITTLE, D. A Storage atmospheres influence chilling injury and chilling injury-induced changes in cell wall polysaccharides of cucumber. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.117, n.6, p.930-933, 1992.

16. MITCHAM, E. J.; GROSS, K. C.; NG, T. J. Tomato fruit cell wall synthesis during development and senescence. In vivo radiolabeling of wall fractions using [¹⁴C] sucrose. **Plant Physiology**, v.89, p.477-481, 1989.
17. NAOHARA, J.; MANABE, M. The properties of pectic de polymerizing enzyme isolated from satsuma mandarin fruits (*Citrus unshiu* Marc.). **Journal Japanese Society of Food Science and Technology**, v.40, p.485-489, 1993.
18. NAOHARA, J.; MANABE, M. Molecular mass and solubility changes in pectins during storage of Satsuma mandarin fruits (*Citrus unshiu* Marc.). **Journal of Food Science**, v.59, n.3, p.578-580, 1994.
19. PROCTOR, A; PENG, L. C. Pectin transitions during blueberry fruit development and ripening. **Journal of Food Science**, v.54, p.385-387, 1989.
20. REDGWELL, R. J. Cell wall synthesis in kiwifruit following postharvest ethylene treatment. **Phytochemistry**, v.41, n.2, p.407-413, 1996.
21. SELVENDRAN, R. R.; RYDEN, P. Isolation and analysis of plant cell walls. In: DEY, P. M. & HARBORNE, J. B. **Methods in Plant Biochemistry**. Ed. P. M. Dey. London: Academic Press, 1990. vol.2, pp.549-580.
22. SHALOM, N. B.; HANZON, J.; KLEIN, J. D.; LURIE, S. A postharvest heat treatment inhibits cell wall degradation in apples during storage. **Phytochemistry**, v.34, n.4, p.955-958, 1993.
23. SHEWFELT, A L.; PAYNTER, V. A; JEN, J. J. Textural changes and molecular characteristics of pectic constituents in ripening peaches. **Journal of Food Science**, v.36, p.573-575, 1971.
24. SIDDIQUI, S.; BRACKMANN, A; STREIF, J.; BANGERTH, F. Controlled atmosphere storage of apples: cell wall composition and fruit softening. **Journal of Horticultural Science**, v.71, n.4, p.613-620, 1996.
25. YUEN, C. M. C.; TRIDJAJA, N. O Chilling injury development of 'Tahitian' lime, 'Emperor' mandarin, 'Marsh' grapefruit and 'Valencia' orange. **Journal Science and Food Agricultural**, v.67, p.335-339, 1995.

CONCLUSÕES GERAIS

No presente trabalho pôde-se concluir que:

- A fase de amadurecimento interno (suco) das tangerinas ‘Fortune’ coincidiu com o início da degradação do amido, diminuição dos açúcares redutores e uma baixa atividade da enzima sacarose fosfato sintase (SPS) do flavedo. A atividade da SPS $V_{m\acute{a}x}$ foi maior que a da sacarose sintase (SS) nos frutos menos maduros e a da SS foi maior nos mais maduros.

- O acondicionamento dos frutos a 37°C por 3 dias (tratamento de cura) evitou os sintomas de injúria pelo frio no flavedo das tangerinas e os inibiu nas laranjas ‘Navelate’. Durante a cura houve maior produção de CO₂ e de etileno nos frutos ‘Fortune’. Nas tangerinas e laranjas curadas e armazenadas a 2°C a sacarose manteve-se mais elevada do que nos frutos não curados armazenados a 2°C e curados e não curados a 12°C, enquanto que os açúcares redutores e o amido diminuíram.

- Em geral, os frutos ‘Pinalate’, resistentes ao frio, apresentaram um maior conteúdo de sacarose, glicose, frutose e amido do que as laranjas ‘Navelate’, assim como uma maior atividade da SPS $V_{m\acute{a}x}$ e da SS.

- Os resultados gerais indicam que o aumento em sacarose pode ser um dos mecanismos implicados no efeito benéfico da cura, e que o metabolismo dos carboidratos do flavedo dos frutos está relacionado com a aclimação dos frutos cítricos ao estresse pelo frio, tornando-os mais resistentes às injúrias provocadas pelo frio.

- No flavedo e albedo, durante a maturação das tangerinas ‘Fortune’, o material de parede celular ou os sólidos insolúveis em etanol (SIE) e seus constituintes diminuíram, devido principalmente, ao acúmulo de sólidos solúveis em etanol. De maneira geral, durante a maturação e tratamentos aplicados, o teor de pectina total, hemicelulose e celulose foi maior para o albedo do que para o flavedo.

- Com o processo de cura e após 30 dias de armazenamento em alguns tratamentos observou-se que no flavedo e albedo: parece ter ocorrido síntese de parede celular; houve aumento de pectina total nos estádios I e II de maturação e diminuição no estágio III e; houve diminuição da hemicelulose e somente após os 30 dias de

armazenamento diminuição da celulose. No estágio III, quando os frutos estavam mais maduros, verificou-se melhor relação entre a diminuição da fração insolúvel de pectina - PSH (pectina solúvel em HCl) e o aumento das frações solúveis da pectina - PSA (pectina solúvel em água) e PSO (pectina solúvel em oxalato de amônia).

– Parece haver relação entre a susceptibilidade das tangerinas ao frio com as modificações dos polissacarídeos da parede celular durante a maturação dos frutos, porém durante o armazenamento a 2°C de frutos não curados, somente se pôde observar maior diminuição de hemicelulose.

– A textura dos frutos diminuiu do estágio II para o III de maturação com o tratamento de cura e durante o armazenamento dos frutos, principalmente a 12°C.