

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Indução de tolerância de frutos às injúrias de frio: aspectos fisiológicos e
bioquímicos**

Ivan Sestari

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ivan Sestari
Engenheiro Agrônomo

Indução de tolerância de frutos às injúrias de frio: aspectos fisiológicos e bioquímicos

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO ALFREDO KLUGE**

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Sestari, Ivan

Indução de tolerância de frutos às injúrias de frio: aspectos fisiológicos e bioquímicos /
Ivan Sestari. - - Piracicaba, 2010.
142 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Antioxidantes 2. Banana 3. Bioquímica vegetal 4. Danos por fatores ambientais
5. Enzimas 6. Estresse oxidativo 7. Fisiologia vegetal 8. Lima 9. Reguladores vegetais
Título

CDD 634.772
S494i

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico aos meus pais, Rosane e Ivo pelo apoio e estímulo ao longo de mais esta etapa de minha vida e, a Gracieli, pelo incentivo, paciência e carinho durante o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Ricardo Alfredo Kluge pela acolhida em seu laboratório, pelo apoio, orientação e acima de tudo pela amizade, confiança e pelas oportunidades. Meu sincero agradecimento a você professor!

Aos colegas e amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Pós-Colheita, em especial à Maria Luiza, Fabiana, Fernando e Felipe pela consideração, amizade e fundamental ajuda na execução deste projeto.

A todos os estagiários do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Pós-Colheita pelo auxílio na montagem e avaliação dos experimentos.

Ao professor Paulo Roberto de Camargo e Castro pelas oportunidades, ensinamentos e principalmente pela amizade.

Ao professor Ricardo Antunes de Azevedo, por disponibilizar a infra-estrutura e os equipamentos do seu laboratório.

Às colegas Carolina Cristina Monteiro e Priscila Lupino Gratão pela disponibilidade e valiosa ajuda com as metodologias e os ensaios enzimáticos.

Aos colegas e amigos Marcelo Lattarulo Campos e Giovani Rossi pelas boas conversas.

Aos professores Lázaro Eustáquio Pereira Peres, Angelo Pedro Jacomino e Eduardo Purgatto pelas valiosas contribuições ao projeto no exame de qualificação.

Ao Sr. José Carlos de Andrade, do Sítio da Chuva, pela generosa doação da lima ácida utilizada para realização deste e de outros experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Planas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de estudo e do auxílio à pesquisa.

Obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE SIGLAS E SIMBOLOS	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 Revisão Bibliográfica	17
2.1.1 Aspectos econômicos	17
2.1.2 Temperatura e sensibilidade de frutos às injúrias de frio	18
2.1.3 Relações entre as membranas biológicas e as injúrias de frio	20
2.1.4 Geração de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo	21
2.1.5 Sistema antioxidante de defesa vegetal contra as espécies reativas de oxigênio	23
2.1.6 Tecnologias empregadas na pós-colheita para retardar o desenvolvimento das injúrias de frio em frutos	25
2.1.7 Influência da temperatura sobre a biossíntese do etileno e o desenvolvimento de injúrias de frio	29
2.2 Experimento 1	32
Tratamentos térmicos retardam o desenvolvimento de injúrias de frio em lima ácida ‘Tahiti’	32
2.2.1 Material e Métodos	32
2.2.2 Delineamento experimental e análise dos dados	37
2.2.3 Resultados e Discussão.....	38
2.2.4 Conclusões.....	55
2.3 Experimento 2	56
Redução das injúrias de frio em lima ácida ‘Tahiti’ por meio da aplicação de metil jasmonato, salicilato e 1-metilciclopropeno.....	56
2.3.1 Material e Métodos	56
2.3.2 Delineamento experimental e análise dos dados	61
2.3.3 Resultados e Discussão.....	62
2.3.4 Conclusões.....	78

2.4 Experimento 3	79
Tratamento térmico com água retarda o desenvolvimento dos sintomas de dano de frio em bananas ‘Nanicão’	79
2.4.1 Material e Métodos	79
2.4.2 Delineamento experimental e análise dos dados.....	84
2.4.3 Resultados e Discussão	85
2.4.4 Conclusões	100
2.5 Experimento 4	101
A inibição da percepção do etileno retarda o desenvolvimento das injúrias de frio em bananas ‘Nanicão’	101
2.5.1 Material e Métodos	101
2.5.2 Delineamento experimental e análise dos dados.....	106
2.5.3 Resultados e Discussão	107
2.5.4 Conclusões	122
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123
REFERÊNCIAS	125

RESUMO

Indução de tolerância de frutos às injúrias de frio: aspectos fisiológicos e bioquímicos

Experimentos foram conduzidos com o propósito de investigar as respostas fisiológicas e bioquímicas associadas à indução de tolerância de frutos às injúrias de frio, e o envolvimento do etileno e do sistema antioxidante de defesa neste processo. Para isso, bananas ‘Nanicão’ e limas ácidas ‘Tahiti’ foram submetidas a tratamentos que estimularam a síntese ou bloquearam a ação do etileno e a tratamentos térmicos. No primeiro e terceiro experimentos, os frutos foram condicionados a 37°C por 10 horas, ou imersos em água a 45°C por 15 minutos ou a 53°C por 2 minutos, antes do armazenamento a 1°C (lima ácida) ou 6°C (banana). No segundo experimento, limas ácidas foram imersas em soluções contendo 1,0mM de metil jasmonato ou metil salicilato ou expostas a 1000nL L⁻¹ de 1-MCP, antes do armazenamento a 1°C (controle). No quarto experimento, bananas foram expostas ou não (controle) a 1000nL L⁻¹ de 1-MCP antes do armazenamento a 6°C. A temperatura e o tempo de exposição dos frutos aos tratamentos com calor influenciaram diretamente a geração e o acúmulo de radicais livres nos tecidos, o que repercutiu em diferente indução de tolerância à baixa temperatura. A aplicação de tratamentos térmicos moderados reduziu a sensibilidade dos tecidos ao etileno, promoveu maior manutenção da estabilidade das membranas, e resultou em menores índices de injúrias de frio ao final do armazenamento de ambos os frutos estudados. Entretanto, ficou evidente que, no caso da banana, a tolerância induzida pelos tratamentos térmicos é temporária, restringindo-se a poucos dias após a exposição à refrigeração. O estresse desencadeado pelo condicionamento dos frutos a 37°C por 10 horas foi severo, pois aumentou a geração de espécies reativas de oxigênio nos tecidos, favorecendo a antecipação do desenvolvimento das injúrias de frio em ambos os frutos. O tratamento da lima ácida com 1,0mM de metil jasmonato ou metil salicilato elevou, consideravelmente, a atividade das enzimas antioxidantes presentes no flavedo dos frutos e essa maior capacidade de remoção das espécies reativas de oxigênio foi acompanhada de significativa redução na incidência de injúrias de frio quando comparada ao controle. Adicionalmente, na lima ácida, o bloqueio da ação do etileno não suprimiu a sua evolução durante o armazenamento, consequentemente, a presença deste etileno residual reduziu a capacidade de remoção do peróxido de hidrogênio do flavedo dos frutos. Em contraste, a inibição da percepção do etileno e a supressão da evolução de sua síntese durante o armazenamento da banana foi responsável pela redução da sensibilidade dos frutos às injúrias de frio. A associação entre baixa temperatura e etileno favoreceu o estresse oxidativo, pois reduziu a capacidade de remoção de espécies reativas de oxigênio, induzindo eventos ligados à degradação das membranas celulares. Em suma, a efetividade dos tratamentos avaliados em induzir aos frutos tolerância ao frio está ligada não apenas ao estresse oxidativo, mas também a outros fatores como a presença do etileno no tecido. Possivelmente, a interação desses fatores com a baixa temperatura seja determinante na modulação da resposta requerida para promover maior ou menor tolerância ao frio.

Palavras-chave: Etileno; Estresse oxidativo; Espécies reativas de oxigênio; Enzimas antioxidantes; Banana; Lima ácida ‘Tahiti’

ABSTRACT

Induction of fruit tolerance to chilling injury: physiological and biochemical aspects

Experiments were performed with the purpose to investigate physiological and biochemical responses associated to induction of fruit tolerance to chilling injury and the involvement of ethylene and antioxidant defense system in this process. ‘Nanicão’ banana and ‘Tahiti’ lime fruit were submitted to treatments to stimulate or to inhibit ethylene action and heat treatments. In the first and the third experiments, the fruit were conditioned at 37°C for 10 hours or hot water dipped at 45°C for 15 minutes or 53°C for 2 minutes before storage at 1°C (lime) or 6°C (banana). In the second experiment, ‘Tahiti’ lime fruit were immersed in solutions containing 1.0mM methyl jasmonate or 1.0mM methyl salicylate or treated with 1000nL L⁻¹ 1-MCP, before storage at 1°C (control). In the fourth experiment, banana fruit were treated or not (control) with 1000nL L⁻¹ 1-MCP before storage at 6°C. The temperature and exposition time of fruit to heat treatments influences the free radical generation and accumulation in the tissues, causing differential induction of chilling tolerance. The fruit exposure to moderate heat treatments decreased the tissue sensitivity to ethylene, maintained membrane stability and resulting in the lower chilling injury index at the end of storage in both fruit. Nevertheless, it was clear that in the case of banana fruit, the heat-induced tolerance is temporary, and is restricted to few days after the cold exposure. The pre storage conditioning of fruit at 37°C for 10 hours trigger a severe stress, since it increased the generation of reactive oxygen species in the tissues favoring the earlier development of chilling injury symptoms in both fruit. There was a considerable increase in the activity of antioxidant enzymes in the flavedo of lime fruit treated with 1.0mM methyl jasmonate or 1.0mM methyl salicylate and this elevation on capacity to scavenge the reactive oxygen species was accompanied by significant decrease in the chilling injury incidence when compared to control fruit. In addition, in lime fruit, the ethylene perception inhibitor 1-MCP did not suppress the ethylene evolution during storage period; consequently, this residual ethylene did reduce the flavedo tissue capacity to scavenge hydrogen peroxide. On the contrary, the ethylene perception inhibition and the suppression of synthesis evolution during storage of banana fruit reduce the sensitivity of fruit to chilling injuries. The combination between low temperature and ethylene favors the oxidative stress, given that did decrease the capacity to scavenge the reactive oxygen species, which induces membrane deterioration events. In conclusion, the treatment effectiveness to induce cold tolerance to fruit was related not only to oxidative stress but also to other factors as ethylene in the tissue. Probably, the interaction of these factors with low temperature may be determinant in the modulation of response required to promote high or low chilling tolerance.

Keywords: Ethylene; Oxidative stress; Reactive oxygen species; Antioxidant enzymes; Banana fruit; ‘Tahiti’ lime fruit

LISTA DE SIGLAS E SIMBOLOS

1-MCP – 1 - metilciclopropeno
 $^1\text{O}_2$ – oxigênio singlete
ACC – ácido 1 - carboxílico - 1 - aminociclopropano
ACO – 1 - carboxílico - 1 - aminociclopropano oxidase
ACS – S-adenosil-L-metionina metiltioadenosinaliase
APX – ascorbato peroxidase
AsA – ascorbato
BSA – albumina de soro bovino
CAT – catalase
 C_2H_4 – etileno
 CO_2 – gás carbônico
Cu/Zn-SOD – cobre/zinco superóxido dismutase
DHA – dehidroascorbato
DHAR – dehidroascorbato redutase
DTNB – 5,5' – ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico)
DTT – ditionitrosol
EDTA – ácido etileno diamino tetracético
EROs – espécies reativas de oxigênio
Fe-SOD – ferro superóxido dismutase
GR – glutathione redutase
GSH – glutathione reduzida
GSSG – glutathione oxidada
 H_2O_2 – peróxido de hidrogênio
HSP – proteína de choque térmico
LOX – lipoxigenase
MACC – ácido 1- (malonilamino) ciclopropano-1-carboxílico
MDA – malondialdeído
MeJA – metil jasmonato
MeSA – metil salicilato

Mn-SOD – manganês superóxido dismutase

mRNA – ácido ribonucléico mensageiro

NADPH – nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato reduzida

NBT – azul de *p*-nitro tetrazólio

O₂ – oxigênio molecular

O₂⁻ - radical superóxido

OH⁻ - radical hidroxila

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

PAL – fenilalanina amônia liase

PPO – polifenol oxidase

PVPP – polivinil polipirrolidona

SOD – superóxido dismutase

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA – ácido tricloroacético

TEMED – N, N, N', N'- tetrametilenodiamina

TRIS – tris (hidroximetil) aminometano

1 INTRODUÇÃO

A refrigeração é considerada a principal técnica de conservação de frutos e hortaliças após a colheita, por esta razão, constitui um dos elementos chave na fisiologia pós-colheita de frutos. Quando manejada adequadamente, respeitando-se os limites característicos a cada espécie, a redução da temperatura permite, por determinado tempo, manter a qualidade de frutos após a colheita, por influenciar diretamente a velocidade de reações enzimáticas associadas a importantes processos do metabolismo celular. Muitas vezes, entretanto, a temperatura praticada durante o armazenamento, mesmo não sendo letal aos tecidos, pode ocasionar o aparecimento de distúrbios fisiológicos que afetam negativamente a qualidade dos frutos. A banana, assim como a lima ácida, possui baixa tolerância à refrigeração e pode manifestar injúrias devido à ação direta do frio, quando exposta, mesmo que por um breve período, a temperaturas entre 0°C e 12°C.

O desenvolvimento de distúrbios fisiológicos induzidos pela baixa temperatura representa um problema economicamente importante na pós-colheita de frutos, especialmente naqueles de origem tropical e subtropical, pois além de abreviar o período de armazenamento e limitar o transporte de longa distância, resulta em significativa perda de qualidade, repercutindo em menor aceitação desses frutos pelos consumidores.

Por estas razões, ao longo dos últimos anos, consideráveis esforços foram realizados por vários grupos de pesquisa ao redor do mundo, na tentativa de desenvolver tecnologias capazes de conferir aos frutos maior tolerância à baixa temperatura. Algumas dessas tecnologias são de natureza física e consistem em expor os frutos a temperaturas moderadas ou altas por determinados períodos de tempo, antes do armazenamento refrigerado. Outras são de natureza química e baseiam-se em aplicações de reguladores vegetais, como o ácido jasmônico e o salicílico, ou de compostos antagônicos à ação do etileno, como o 1-metilciclopropeno.

Apesar dos promissores resultados obtidos recentemente com estes tratamentos na redução das injúrias de frio, o mecanismo envolvido por trás de seus benefícios e as bases fisiológicas e bioquímicas associadas ao desenvolvimento das injúrias, assim como a indução de tolerância de frutos à baixa temperatura ainda permanecem pouco compreendidas.

Durante várias décadas, o estudo das alterações na estrutura e funcionalidade das membranas celulares induzidas pela baixa temperatura foi o foco principal de teorias que buscavam explicar as origens das injúrias de frio nos tecidos vegetais. Todavia, atualmente sabe-

se que estes não são os únicos fatores responsáveis pelo desenvolvimento das injúrias de frio em frutos. A baixa temperatura, assim como outros agentes estressores, favorece a geração de espécies reativas de oxigênio a níveis acima da capacidade de remoção dos tecidos, o que gera uma série de reações bioquímicas em cascata que culminam com a morte celular e a degradação dos tecidos vegetais, resultando na exteriorização das injúrias.

Em decorrência aos processos de amadurecimento e senescência em frutos ativarem eventos fisiológicos comuns aos induzidos pelas injúrias de frio, tal como a degradação das membranas celulares e a indução de estresse oxidativo, foi proposta a hipótese de que o etileno poderia estar relacionado com o processo de inicialização deste distúrbio. Observações de que, em frutos sensíveis ao frio, a exteriorização das injúrias ocorre, muitas vezes, simultaneamente a acréscimos na evolução da síntese de etileno suportam tal hipótese. Contudo, tal relação ainda não foi completamente entendida e o evento tem demonstrado ser ainda mais complexo do que se imaginava, considerando que a presença do etileno, em alguns casos, acelera e em outros retarda o desenvolvimento das injúrias de frio.

Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi investigar as respostas fisiológicas e bioquímicas mediadas por tratamentos térmicos e químicos na indução de tolerância de frutos às injúrias de frio. Adicionalmente, o efeito destes tratamentos na biossíntese do etileno e atividade do sistema antioxidante de defesa também foi avaliado. Estas informações poderão ser úteis para o posterior desenvolvimento de tecnologias ou adoção de tratamentos visando uma melhor exploração dos benefícios da refrigeração, de modo a estender a conservação de frutos climatéricos e não climatéricos sensíveis ao frio.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Aspectos econômicos

A banana corresponde ao fruto de maior produção e comercialização mundial, sendo responsável por cerca de 40% do volume total de frutos transacionados no mercado internacional. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de bananas, entretanto sua participação no comércio internacional é inferior a 2% (FAO, 2007). Essa realidade se deve, sobretudo, ao elevado consumo interno, baixa qualidade dos frutos quando comparada a de outros países tradicionalmente produtores, e também a tratados internacionais que criam várias barreiras e inviabilizam a exportação. O produto nacional, de modo geral, não atende às exigências do mercado europeu e norte-americano, principalmente no que se refere a aspectos organolépticos e visuais.

Outro aspecto limitante à produção de frutos com qualidade superior, especialmente nas regiões sul e sudeste onde se encontra a tecnologia mais avançada na produção de banana no Brasil, refere-se à ocorrência de baixas temperaturas em determinado período do ano que podem ocasionar injúrias de frio aos frutos ainda no campo.

A lima ácida ‘Tahiti’ é uma fruteira de origem tropical de recente exploração no Brasil e vem se destacando entre os frutos cítricos de maior importância comercial. O crescimento de sua produção confere à lima ácida ‘Tahiti’ lugar de destaque na citricultura brasileira, o que representa elevação no consumo interno e no volume exportado anualmente. Trata-se de uma variedade que satisfaz as exigências do mercado consumidor, quanto ao tamanho do fruto, ao sabor, à qualidade do suco e à ausência de sementes (BARROS et al., 1991). Segundo dados da FAO, no ano de 2008, o Brasil foi o quarto maior produtor mundial de limões, ficando atrás apenas de México, Índia e Argentina. Embora as estatísticas disponíveis não façam distinção entre limões e limas ácidas, estima-se que cerca de 70% do total da produção mundial seja de limões verdadeiros e o restante de limas ácidas. No caso do Brasil, a maior parte da produção é constituída de limas ácidas da variedade Tahiti, segundo dados do CEAGESP.

De modo geral, há crescente interesse por parte dos produtores para instalação e ampliação de novos plantios comerciais, devido a aspectos relacionados à maior resistência da limeira às pragas e doenças, quando comparada à laranja, e à crescente aceitação dos frutos pelos consumidores europeus e do oriente médio (ESTANISLAU et al., 2001).

A escolha da lima ácida e da banana como modelo vegetal para o presente estudo foi devido à sensibilidade de ambos os frutos às injúrias de frio, ao distinto padrão de síntese de etileno apresentado e à facilidade de obtenção de frutos durante praticamente o ano inteiro. Além disso, ambas frutíferas apresentam significativa importância econômica, social e comercial tanto para o estado de São Paulo quanto para o Brasil.

2.1.2 Temperatura e sensibilidade de frutos às injúrias de frio

O armazenamento refrigerado representa a principal técnica utilizada para manutenção da qualidade e extensão do período pós-colheita de frutos e hortaliças. A redução da temperatura de frutos, após a colheita e sua manutenção em níveis adequados permite a conservação da qualidade, devido à desaceleração do metabolismo celular, retardando o processo de amadurecimento e a senescência dos tecidos (HARDENBURG; WATADA; WANG, 1986). No entanto, em frutos de origem tropical e subtropical, a refrigeração pode ocasionar o aparecimento de distúrbios fisiológicos que afetam negativamente a qualidade dos frutos, assim que os mesmos são removidos da refrigeração.

As injúrias de frio, também conhecidas como dano de frio, dano de *chilling* ou *chilling injury*, pode ocorrer em temperaturas inferiores a 15°C e superiores a 0°C. Por definição, a ocorrência do dano de frio diferencia-se do dano por congelamento, pelo fato de não apresentar a nucleação de gelo no interior celular. De acordo com Lyons (1973), a manifestação dos sintomas de dano de frio em espécies de origem tropical ocorre quando o tecido é exposto a temperaturas próximas a 12°C, enquanto para as espécies de origem subtropical, a temperatura crítica está entorno dos 8°C.

O dano de frio pode ser definido como um conjunto de mudanças de ordem física e/ou fisiológica que ocorrem num dado tecido vegetal e que são induzidas pela baixa temperatura. O dano primário, em nível de ultra-estrutura é semelhante entre os tecidos vegetais, sejam eles folhas ou frutos, e inclui a redução da corrente citoplasmática, desorganização e mudança na estrutura e funcionalidade do aparato mitocondrial, dos cloroplastos e do núcleo celular (KRATSH; WISE, 2000). Dependendo do tempo de exposição dos tecidos à baixa temperatura este processo pode ser reversível mediante a remoção da refrigeração (SALTVEIT; MORRIS, 1990; RAISON; ORR, 1990). Caso contrário, podem ocorrer danos secundários ao metabolismo celular, os quais são irreversíveis e consequentes das injúrias primárias.

Em alguns casos, a breve exposição de um determinado tecido ao *chilling* pode não ocasionar o desenvolvimento dos sintomas enquanto o tecido for mantido sob refrigeração, porém os sintomas aparecerão gradualmente após a remoção da refrigeração e exposição a temperaturas mais elevadas (SALTVEIT; MORRIS, 1990). De modo geral, quanto mais baixa a temperatura a qual o tecido está exposto, menor o tempo de exposição necessário para desencadear o desenvolvimento dos sintomas. A exteriorização visual dos sintomas também é variável dependendo da espécie submetida ao frio, do tipo de tecido, do estágio de desenvolvimento e do ponto de maturação, no caso de frutos e também de fatores climáticos (LYONS, 1973; SALTVEIT; MORRIS, 1990).

Em citros, assim como em bananas, a sensibilidade ao frio limita a extensão do período de armazenamento, a comercialização e o transporte de longa distância, devido à restrição ao uso de temperaturas mais baixas (KADER; ARPAIA, 2002). A exposição da lima ácida a temperaturas entre 0°C e 8°C resulta no aparecimento de pontuações necróticas no flavedo, podendo também afetar o albedo dos frutos (Figura 1A). Com o prolongamento da exposição à temperatura indutora de *chilling*, as pontuações podem vir a coalescer, formando regiões deprimidas e descoloridas que culminam com o colapso da região afetada (MARTINEZ-TÉLLEZ; LAFUENTE, 1997; SÁNCHEZ-BALLESTA et al., 2003). Apesar dos sintomas externos comprometerem o aspecto visual dos frutos, repercutindo em perdas, a qualidade interna não é afetada (SALA, 1998).

Em bananas, sintomas de *chilling* são manifestados em temperaturas de armazenamento relativamente altas (12°C) e são agravados com o declínio da temperatura (CHEN et al., 2008). Se comparada à lima ácida, a banana pode ser considerada extremamente sensível ao frio (PANTASTICO, 1990). Quando os frutos são submetidos a temperaturas levemente inferiores a 12°C, mesmo que por um curto período, há formação de pontuações necróticas e escurecimento da casca (Figura 1B). Além disso, outros sintomas secundários como enrijecimento da polpa, ausência de aroma característico e amadurecimento anormal também são evidenciados, o que (GRIERSON, et al., 1967; PANTASTICO, 1990) inviabiliza a comercialização por afetar não apenas a casca mas o fruto por completo.



Figura 1 – Exteriorização visual das injúrias de frio em lima ácida ‘Tahiti’ (A) e bananas ‘Nanicão’ (B) armazenadas durante 45 dias a 1°C ou 15 dias a 6°C, respectivamente

2.1.3 Relações entre as membranas biológicas e as injúrias de frio

Em nível molecular, acredita-se que a alteração na conformação e estrutura dos lipídios que compõe as membranas biológicas, seja o evento inicial que desencadeia as injúrias de frio nos tecidos vegetais (LYONS, 1973; RAISON; ORR, 1990). Ao longo do tempo, o dano nas membranas decorrente da ação do frio tem sido amplamente estudado e demonstrado por meio de diversos parâmetros, como acréscimos no vazamento de íons mensurando-se a condutividade elétrica de uma solução isotônica cujo tecido foi previamente incubado (KING; LUDFORD, 1983; MARANGONI; PALMA; STANLEY, 1996), transição de fase de lipídios da membrana a uma dada temperatura crítica (LYONS, 1973; McMURDO; WILSON, 1980), além de alterações no índice de saturação dos ácidos graxos (PARKIN; KUO, 1989; WHITAKER, 1994, 1995; MARANGONI; PALMA; STANLEY, 1996; LACAN; BACCOU, 1996).

Além do efeito da temperatura, as membranas celulares também podem ser desestabilizadas por meio da peroxidação lipídica mediada por enzimas, como a lipoxigenase (LOX) ou pela ação direta de radicais livres (SHEWFELT; PURVIS, 1995; BERGER et al., 2001). Em espécies sensíveis ao frio, tem sido sugerido que a baixa temperatura intensifica o estresse oxidativo dos tecidos (SALA, 1998; HARIYADI; PARKIN, 1991; WANG, 1995; DAT et al., 2000) por alterar o equilíbrio entre a geração e remoção de radicais livres, como o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio (ZHANG et al., 1995). Quando produzidas em excesso, essas espécies reativas de oxigênio podem ser potencialmente danosas ao metabolismo celular, pois agravam o estresse oxidativo promovendo a desestabilização das membranas biológicas e a

inativação de enzimas associadas ao metabolismo energético, entre várias outras enzimas relacionadas a importantes funções metabólicas (WANG, 1995; HODGES et al., 2004; MAALEKUU et al., 2006; DE SANTIS et al., 1999).

Durante o processo de peroxidação lipídica, a degradação de ácidos graxos poliinsaturados como o linoléico e linolênico, tem como subprodutos principais os íons peróxido e o malondialdeído (MDA), os quais podem ser mensurados com relativa facilidade no tecido vegetal por meio da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O acúmulo dessas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), tem sido amplamente utilizado como indicativo de estresse oxidativo (HODGES et al., 1999) e da integridade estrutural das membranas celulares de tecidos vegetais expostos a situações de estresse, a exemplo do *chilling* (POSMYK et al., 2005). Além disso, em vários casos, o conteúdo de TBARS acumulado no tecido está diretamente relacionado à extensão do estresse sofrido pelo tecido vegetal (LUKATKIN, 2002). Desta forma, devido à temperatura influenciar diretamente a fluidez e a funcionalidade das membranas biológicas e dos complexos enzimáticos associados a ela (MARANGONI; PALMA; STANLEY, 1996; DE SANTIS et al., 1999), é possível afirmar que a manutenção da integridade e estabilidade das membranas é crucial do ponto de vista energético e organizacional e pode ser considerada fundamental para a aquisição de resistência das plantas e frutos ao frio (TOIVONEN, 1992; KISLYUK; MIROSLAVOV; PALEEVA, 1995; ZYKOVA; KOLESNICHENKO; VOINIKOV, 2002; SARUYANA et al., 2004).

2.1.4 Geração de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

A homeostase celular é alcançada por meio de um delicado balanço entre inúmeras rotas bioquímicas interdependentes e que ocorrem simultaneamente em diferentes organelas (SUZUKI; MITTLER, 2002). Esse equilíbrio pode vir a ser severamente afetado durante uma situação de estresse por temperatura, pois os vários sistemas enzimáticos que compõe as rotas bioquímicas possuem diferentes temperaturas ótimas para seu funcionamento (SUZUKI; MITTLER, 2002). À medida que o equilíbrio metabólico é perdido ou alterado, diferentes rotas podem ser afetadas e acumular intermediários tóxicos, ou ainda serem desacopladas e, neste caso, os elétrons de alta energia que fluíam por um dado caminho podem vir a ser transferidos diretamente ao oxigênio molecular, intensificando a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de uma série de reações em cascata que culminam com a morte celular (ASADA; TAKAHASHI, 1987;

MITTLER, 2002).

As reações de redução do oxigênio molecular requerem uma inicialização, enquanto as demais reações subsequentes são espontâneas, catalisadas ou não (VAN BREUSEGEM et al., 2001). A completa redução do oxigênio requer quatro elétrons e tem como produto final a água, no entanto quando a redução segue passos independentes são formados intermediários reativos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000) como o superóxido (O_2^-); o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot). O oxigênio singlete (1O_2), embora também seja um potente radical, é gerado exclusivamente por meio da excitação física do oxigênio molecular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; HODGES, 2004).

De modo geral, as espécies reativas de oxigênio são consideradas como subprodutos do metabolismo celular, especialmente em organelas cuja atividade metabólica oxidante é elevada, como no caso das mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (PRASAD et al., 1994; DAT et al., 2000).

O radical superóxido pode ser também produzido na cadeia de transporte de elétrons e em reações catalisadas por enzimas como a lipoxigenase, a xantina e a aldeído oxidases (SCANDALIOS, 1993). Embora o superóxido não seja tão altamente tóxico comparado ao oxigênio singlete e ao radical hidroxila, ele pode atacar diretamente os lipídios das membranas (ALSCHER; AMTHOR, 1988). Além disso, o superóxido pode reagir não enzimaticamente com o peróxido de hidrogênio na presença de metais de transição, gerando o radical hidroxila.

O peróxido de hidrogênio, por sua vez, pode ser gerado durante a reação de dismutação do superóxido catalisada pelas superóxido dismutases, β -oxidação de ácidos graxos, durante as reações de fotorrespiração envolvendo a oxidação do glicolato e também durante a formação da lignina catalisada por peroxidases ligadas à parede celular (PRASAD et al., 1994; MITTLER, 2004).

Os principais locais de geração do 1O_2 são a cadeia de transporte de elétrons entre compostos foto excitados, como a clorofila e também como subproduto da atividade da lipoxigenase (THOMPSON et al., 1991; HODGES, 2004).

O radical hidroxila, produto da redução do peróxido de hidrogênio, é conhecido como um dos mais potentes agentes oxidantes encontrados no metabolismo celular (SALIN, 1988). O processo de redução, conhecido como reação de Haber-Weiss, envolve a interação entre o H_2O_2 e o O_2^- , a qual é catalisada por metais de transição, como o cobre ou ferro. A clivagem do H_2O_2 pelo

metal reduzido (Fe^{2+}) gera o OH^- e é denominada reação de Fenton. Em função de sua elevada reatividade e inespecificidade, o radical hidroxila é altamente nocivo às proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; VAN BREUSEGEM et al., 2001).

Mesmo em plantas submetidas a condições ótimas de crescimento verifica-se a geração de EROs em níveis baixos. Todavia, em situações de estresse há uma abrupta elevação na taxa de produção destes radicais livres; isto é, a geração excede a capacidade do tecido ou organismo em manter a homeostase celular, ocorrendo assim o estresse oxidativo. Apesar da natureza destrutiva e dos efeitos nocivos ocasionados pelas EROs durante uma situação de estresse, como no caso da baixa temperatura, alguns estudos têm sugerido que as EROs podem desempenhar importante papel como moléculas transdutoras de sinal, mediando variadas respostas, relacionadas à infecção por patógenos, estresses ambientais, além da morte celular programada (MITTLER et al., 2004; TORRES; DANGL, 2005).

2.1.5 Sistema antioxidante de defesa vegetal contra as espécies reativas de oxigênio

O estresse imposto aos tecidos vegetais, quando submetidos à condição de *chilling*, favorece a intensificação do estresse oxidativo na célula vegetal devido a intensificação da geração de EROs, as quais podem atacar diretamente a porção lipídica das membranas, inativar enzimas e danificar os ácidos nucleicos (MITTLER, 2002). A natureza reativa das EROs as torna potencialmente danosas a todas as organelas celulares, podendo desencadear uma série de reações em cascata que culminam com a ocorrência de distúrbios metabólicos que podem, em última instância, ocasionar a morte celular (VAN BREUSEGEM et al., 2001).

De modo a evitar o acúmulo indiscriminado de radicais livres e reparar o dano oxidativo, os vegetais desenvolveram um complexo e eficiente sistema de remoção das EROs (NOCTOR; FOYER, 1998). Esse sistema envolve a participação de antioxidantes lipossolúveis associados às membranas biológicas (α – tocoferol e β – caroteno); redutores hidrossolúveis, como o ascorbato (AsA) e a glutatona (GSH); e enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutatona redutase (GR).

Além do sistema descrito acima, outras substâncias de ocorrência natural no metabolismo celular vegetal têm sido estudadas e a elas atribuída ação antioxidante, como os isoflavonóides, fenóis, poliaminas e aminoácidos específicos, como a cisteína e a metionina (LARSON, 1988; LEVINE et al., 1996; ROBARDS et al., 1999).

As superóxido dismutases (SODs) são consideradas enzimas chave dentro do sistema antioxidante de defesa vegetal, pois regulam a concentração celular tanto do superóxido quanto do peróxido de hidrogênio (VAN BREUSEGUEM, et al., 2001). As SODs estão distribuídas no citoplasma, cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (FRIDOVICH, 1986; ELSTNER, 1991; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; SANDALIO; PALMA; DEL RÍO, 1987) e são classificadas de acordo com o tipo de metal presente em seu sítio catalítico (Fe, Mn ou Cu/Zn). A isoforma Cu/Zn-SOD ocorre no citoplasma e estroma; a isoforma Fe-SOD está presente apenas no cloroplasto; enquanto a Mn-SOD ocorre tanto na matriz mitocondrial quanto nos peroxissomos (USHIMARU et al., 1995; SCANDALIOS, 1993; BOWLER et al., 1994).

O peróxido de hidrogênio resultante da ação das SODs é eliminado pelas catalases e peroxidases. As catalases não requerem equivalente redutor para sua atividade e são responsáveis pela remoção do excesso de H₂O₂ gerado durante uma dada situação de estresse. Por outro lado, as peroxidases dependentes de ascorbato (APXs) possuem uma maior afinidade pelo H₂O₂ e são responsáveis pela remoção do H₂O₂ em locais inacessíveis à catalase (SCANDALIOS, 1994; CREISSEN; EDWARDS; MULLINEAUX, 1994; MITTLER, 2002).

O ciclo ascorbato-glutationa, também conhecido como Halliwell-Foyer-Asada, representa uma importante via de remoção do H₂O₂ em organelas onde este radical é produzido e a catalase não está presente (DEL RÍO et al., 2002). Esse ciclo é composto pelos antioxidantes não enzimáticos ascorbato e glutaciona, que são oxidados e reduzidos em uma série de reações catalisadas por quatro enzimas antioxidantes: monodehidroascorbato redutase (MDHAR), dehidroascorbato redutase (DHAR), ascorbato redutase (APX) e glutaciona redutase (GR) (NOCTOR; FOYER, 1998).

Em última análise, a principal função dos antioxidantes e das enzimas antioxidantes relacionadas ao processo de remoção das EROs é interromper as cascatas de oxidação descontroladas (NOCTOR; FOYER, 1998) e reparar os danos ocasionados ao metabolismo celular (MÖLLER, 2001).

Atualmente, tem sido amplamente aceita a idéia de que o desenvolvimento das injúrias de frio em frutos envolve a participação do estresse oxidativo (SALA, 1998; KANG; SALTVEIT, 2001; HODGES et al. 2004; TOIVONEN, 2004; PURVIS, 2004). Em tangerinas, Sala (1998) verificou que cultivares tolerantes ao frio dispõem de um sistema antioxidante mais eficiente em metabolizar o peróxido de hidrogênio gerado durante o estresse, do que as cultivares sensíveis ao

frio. Dessa forma, foi sugerido que o acréscimo simultâneo na atividade das enzimas antioxidantes, SOD, CAT, APX e GR, seria primordial para promover uma maior tolerância de plantas e frutos ao frio (FOYER et al., 1997; LACAN; BACCOU, 1998; WISMER, 2003).

2.1.6 Tecnologias empregadas na pós-colheita para retardar o desenvolvimento das injúrias de frio em frutos

A observação da temperatura mínima de segurança para o armazenamento de cada espécie de fruto sensível ao frio representa a principal forma de evitar que as injúrias de frio se desenvolvam e comprometam atributos de qualidade, os quais repercutirão em perdas durante o armazenamento e comercialização. Como isso nem sempre é possível, alternativas têm sido estudadas de modo a reduzir ou aliviar os sintomas das injúrias de frio, possibilitando um melhor aproveitamento dos benefícios da refrigeração sobre a conservação de frutos e hortaliças sensíveis (LURIE, 1998). As variadas técnicas disponíveis atualmente são baseadas em tratamentos de natureza física ou química, ou de sua associação com o objetivo de retardar, inibir ou aliviar as injúrias de frio.

Os tratamentos térmicos, embora já venham sendo otimizados em alguns países há várias décadas, como o tratamento quarentenário de insetos e fungos, também demonstraram ser eficazes na redução dos sintomas de *chilling* em várias espécies de citros (SCHIRRA; D'HALLEVIN, 1997; SALA; LAFUENTE; 2000; SAPINITSKAYA et al., 2006; GASEMNEZHAD et al., 2008); uvas (ZHANG et al., 2005); tomates (LURIE; SABEHAT, 1997; MACDONALD; MCCOLLUM; BALDWIN, 1999; SOTO-ZAMORA et al., 2005); mangas (PESIS et al., 1997; TASNEEM, 2004); abacates (WOOLF et al., 1995); pimentões (GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2000); e bananas (PROMYOU; KETSA; VAN DOORN, 2008; KANDEE; KETSA; VAN DOORN, 2009). Contudo, a resposta em alguns casos pode ser específica a determinada cultivar (LURIE, 1998). Os tratamentos térmicos podem ser aplicados na forma de imersão dos frutos em água quente ou por meio da exposição ao ar aquecido (FALLIK, 2004). Para cada situação o tempo e a temperatura de exposição necessária para obtenção de maior tolerância ao frio são variáveis e dependentes do tipo de fruto, da cultivar, do estágio de maturação e de condições pré-colheita (LURIE, 1998; FALLIK, 2004).

Os tratamentos térmicos podem, além de aumentar a tolerância dos frutos às baixas temperaturas, possibilitar o armazenamento em temperatura mais baixa daquela normalmente

recomendada (SCHIRRA et al., 2004). Embora a redução da sensibilidade ao frio tenha sido relatada em vários frutos submetidos a tratamentos térmicos, o possível mecanismo envolvido na indução de tolerância ao frio permanece ainda pouco compreendido. Alguns estudos têm atribuído tais benefícios à síntese de proteínas de choque térmico (HSP) em resposta ao estresse promovido pela exposição temporária dos frutos ao calor (VIERLING, 1991; LURIE; SABEHAT, 1997), enquanto outros sugerem que os tratamentos térmicos estimulam a atividade de enzimas antioxidantes, prevenindo a acumulação de radicais livres e o dano oxidativo aos tecidos (SALA; LAFUENTE, 1999; 2000; RIVERA, et al. 2004; ZHANG et al., 2005; GASEMNEZHAD et al., 2008).

O condicionamento térmico de tangerinas ‘Fortune’ a 37°C por três dias antes da refrigeração dos frutos a 2°C durante 8 semanas, resultou em maior atividade da SOD, CAT e APX, e redução da atividade da GR, quando comparada aos frutos não condicionados os quais apresentaram maior suscetibilidade às injúrias de frio (SALA; LAFUENTE, 1999).

A imersão de bananas ‘Namwa’ e ‘Gros Michel’ em água a 42°C por 15 minutos, antes da refrigeração a 4°C, retardou a iniciação do escurecimento da casca por no máximo quatro dias, evidenciando a elevada sensibilidade desses frutos à baixa temperatura. Ainda, neste estudo, foi observado que para ambas as cultivares, o menor índice de escurecimento da casca esteve associado a um acréscimo na relação entre ácidos graxos insaturados/saturados (PROMYOU; KETSA; VAN DOORN, 2008).

Além dos tratamentos térmicos, outras estratégias de combate às injúrias de frio vêm sendo estudadas, as quais têm como base a utilização de tratamentos com reguladores vegetais e substâncias inibidoras da ação do etileno.

O ácido salicílico, composto fenólico proveniente do metabolismo fenilpropanóide, é uma molécula sinalizadora, envolvida na indução de mecanismos de defesa das plantas contra variados tipos de estresse (RASKIN, 1992; JANDA et al., 1999; SHAH, 2003; HALIM et al., 2006; WANG; LI, 2006). Evidências sugerem que o ácido salicílico pode estar diretamente associado ao estresse oxidativo, desempenhando um papel essencial na prevenção do dano decorrente da ação de radicais livres (BOWLER et al., 1994). Também, acredita-se que um dos modos de ação do ácido salicílico envolva a inibição da catalase, promovendo assim um acréscimo no conteúdo celular de H₂O₂ o qual atua como mensageiro secundário ativando genes relacionados à defesa (CHEN; RICIGLIAN; KLESSIG, 1993).

Em plântulas de milho, acréscimos na tolerância ao *chilling* foram observados mediante a aplicação de ácido salicílico na concentração de 0,5mM via solução hidropônica (JANDA et al., 1999; JANDA et al., 2000). Neste mesmo estudo, a intensificação da tolerância ao frio foi acompanhada por acréscimos na atividade da glutatona redutase e guaiacol peroxidase e redução na atividade da catalase.

Em *Musa acuminata*, a aplicação de 0,5mM de solução contendo ácido salicílico diretamente nas folhas ou via irrigação aumentou a tolerância das plântulas ao *chilling* (KANG et al., 2003). Os autores relataram nesta pesquisa, que na temperatura de 30°C o conteúdo de H₂O₂ aumentou após o tratamento com o ácido salicílico, contudo, quando as plântulas foram expostas a 5°C houve decréscimo no conteúdo de H₂O₂, devido à intensificação da atividade da SOD, CAT e APX nas folhas das plântulas tratadas.

Recentes investigações indicam que o ácido salicílico pode reduzir os sintomas de *chilling* não apenas em plantas intactas, mas também em frutos (HORVÁTH; SZALAI; JANDA, 2007). Ding et al. (2001), relataram que tomates tratados com 0,01mM de metil salicilato (MeSA) ou jasmonato (MeJA) adquiriram resistência ao *chilling* induzido pela temperatura de 5°C. Em ambos os casos, a adaptação ao frio foi atribuída à síntese de proteínas de estresse, em particular proteínas de choque térmico de baixo peso molecular (sHSPs).

Apesar dos benefícios relatados anteriormente é importante salientar que a indução de tolerância a estresses abióticos promovida pelo ácido salicílico é variável entre as espécies (KOGEL; LANGEN, 2005). Além disso, a resposta a determinado tipo de estresse está estritamente ligada tanto à concentração endógena do referido hormônio presente no tecido quanto à aplicada exogenamente (DING; WANG, 2003; HORVÁTH; SZALAI; JANDA, 2007). De acordo com Wang et al. (2006), em pêssegos, altas concentrações de ácido salicílico tendem a diminuir a tolerância dos frutos ao frio.

Coletivamente referidos como jasmonatos, o ácido jasmônico (JA) e seu metil éster, metil jasmonato (MeJA), são representantes de uma classe hormonal envolvida com processos de crescimento, desenvolvimento e amadurecimento de frutos, além de mediarem importante papel na sinalização e defesa vegetal contra estresses bióticos e abióticos (CREELMAN; MULLET, 1997).

A redução dos sintomas de *chilling* mediante a aplicação de jasmonatos em frutos e hortaliças foi primeiramente reportada por Wang e Buta (1994). De acordo com estes

pesquisadores, o tratamento da abobrinha italiana com MeJA promoveu redução dos sintomas de *chilling* durante o armazenamento refrigerado e posterior período de prateleira à temperatura ambiente. Neste estudo, tal efeito foi atribuído ao incremento dos níveis de poliaminas e ácido abscísico nos frutos tratados com MeJA. Outras pesquisas realizadas posteriormente também demonstraram que a aplicação exógena do MeJA reduz a incidência de sintomas relacionados ao dano de frio em tomate, manga, goiaba, pimentão, abacate, uva, nêspera e mamão (DING et al., 2001; GONZÁLEZ-AGUILAR; BUTA; WANG, 2003; MEIR et al., 1996; FUNG et al., 2004; CAO et al., 2009; GONZÁLEZ-AGUILAR; FORTIZ; WANG, 2000).

Ding et al. (2001) e Fung et al. (2004) relataram que após o tratamento de tomates e pimentões com MeJA seguida da exposição dos frutos à condição de *chilling*, foi observado significativo incremento nos níveis de transcritos de proteínas de choque térmico, oxidase alternativa e proteínas relacionadas à patogênese. De acordo com estes autores, a ativação destes genes associados à defesa teve estreita ligação com a redução dos sintomas de *chilling* nestes frutos. Em estudo conduzido por Cao et al. (2009), com objetivo de avaliar o efeito do MeJA sobre o sistema antioxidante e composição de ácidos graxos de nêspersas submetidas ao *chilling*, foi verificado que a atividade da CAT e APX diminui enquanto o conteúdo de O_2^- e H_2O_2 aumenta, concomitante com o desenvolvimento dos sintomas de *chilling* nos frutos controle. Por outro lado, a exposição dos frutos durante 24 horas a $10\mu M L^{-1}$ de MeJA seguida do armazenamento a $1^\circ C$, reduziu significativamente o enrijecimento da polpa e escurecimento interno dos frutos além de intensificar a atividade da SOD, CAT e APX sob a condição de estresse. Além de reduzir a severidade dos sintomas de dano de frio nos frutos o tratamento com MeJA manteve significativamente alta a relação entre ácidos graxos insaturados/saturados quando comparada aos frutos controle (CAO et al., 2009). Esses resultados sugerem que possivelmente exista uma estreita relação entre o desenvolvimento dos sintomas de *chilling* em nêspersas e o estresse oxidativo induzido pelo frio.

A presença do etileno no ambiente de armazenamento parece induzir ou intensificar o aparecimento dos sintomas de *chilling* em alguns frutos climatéricos e não-climatéricos, especialmente quando associada à baixa temperatura, porém em alguns casos a presença do etileno exerce efeito contrário, reduzindo os sintomas (ZHOU; BEN-ARIE; LURIE, 2001; WANG et al., 2006). Embora o objetivo principal da aplicação do 1- metilciclopropeno (1-MCP) não seja a inibição das injúrias de frio em espécies sensíveis e sim o controle da maturação de

modo a estender o período de oferta e regular o fluxo de produto no mercado, os benefícios de sua aplicação sobre a redução do *chilling* são reportados.

Em caquis ‘Rojo Brillante’ (SALVADOR et al., 2004), tangerinas ‘Nova’ e ‘Ortanique’ (SALVADOR et al., 2006) e em abacaxis ‘Queen’ (SELVARAJAH; BAUCHOT; JOHN, 2001), o bloqueio da ação do etileno por meio do 1-MCP reduziu consideravelmente a incidência de injúrias de frio nestes frutos. Em contraste, os sintomas foram intensificados quando o 1-MCP foi aplicado em laranjas ‘Shamouti’ (PORAT et al., 1999), tangerinas ‘Fortune’ (LAFUENTE et al., 2001) e bananas ‘Willians’ (JIANG et al., 2004). Pesis et al. (2002) ao estudarem o envolvimento do etileno com as injúrias de frio ocasionadas durante o armazenamento refrigerado de abacates, observaram que a aplicação de etileno exógeno intensificou a descoloração do mesocarpo de abacates ‘Ettinger’, ‘Hass’ e ‘Fuerte’, durante o armazenamento a 5°C. Contrariamente, a aplicação de 1-MCP antes da refrigeração reduziu os sintomas de dano de frio, avaliados como descoloração do mesocarpo e desenvolvimento de podridões. Também houve redução da atividade da enzima polifenoloxidase (PPO) em todas as cultivares estudadas.

2.1.7 Influência da temperatura sobre a biossíntese do etileno e o desenvolvimento de injúrias de frio

Considerando o fato de que alguns eventos estritamente associados ao processo de amadurecimento e de senescência dos tecidos vegetais são similares aos efeitos decorrentes do estresse por baixa temperatura, atribui-se ao etileno um possível papel na iniciação ou desenvolvimento das injúrias de frio (WANG, 1989; BEN-AMOR et al., 1999). Estudos realizados anteriormente já demonstraram que alguns frutos apresentam maior sensibilidade ao *chilling* quando tratados com etileno (WANG, 1993; PORAT et al., 1999; PESIS et al., 2002). Contudo, em alguns casos, a exposição de frutos ao etileno exógeno demonstrou ser benéfica, reduzindo os sintomas de *chilling* (LIPTON; AHRONI, 1979; WANG et al., 2006). Neste contexto, Wang (1993) relatou que a sensibilidade do tomate e do mamão ao frio reduziu-se à medida que os frutos amadureceram e a síntese de etileno aumentou. Contrariamente, em determinadas espécies sensíveis ao frio foi reportado que a baixa temperatura estimula o acúmulo dos precursores e a atividade das enzimas associadas à biossíntese do etileno, repercutindo em incremento na síntese, concomitante com o desenvolvimento dos sintomas (WANG, 1986;

McCOLLUM; McDONALD, 1991; MARTINEZ-TÉLLEZ; LAFUENTE, 1997; CONCELLÓN; AÑÓN; CHAVES, 2005).

Em pepinos, o conteúdo de ACC no tecido aumentou durante o armazenamento a 20°C ou 10°C, porém apenas a 1°C houve um considerável acúmulo nos tecidos, indicativo de que a atividade da ACC sintase é estimulada pela baixa temperatura (MARTÍNEZ-ROMERO; SERRANO; VALERO, 2003). Resultados semelhantes foram observados em pepinos, pimentões e nectarinas apresentando sintomas de *chilling* (McCOLLUM et al., 1995; SERRANO et al., 1997; ZHOU; BEN-ARIE; LURIE, 2001).

Na maioria das vezes, o desenvolvimento dos sintomas de *chilling* ocorre ou é intensificado apenas quando os frutos são removidos da refrigeração e reaquecidos à temperatura ambiente. Esta característica foi positivamente correlacionada com o abrupto acréscimo na produção de etileno, observado em vários tipos de frutos, tais como: melões, pêras, abobrinha, berinjela, manga, tangerina, laranja e pomelo (BEN-AMOR et al., 1999; WANG; SAMS; GROSS, 1985; BALANDRÁN-QUINTANA et al., 2003; CONCELLÓN; AÑÓN; CHAVES, 2005; LEDERMAN et al., 1997; LAFUENTE et al., 2003; SCHIRRA, 1993). De acordo com Sevillano et al. (2008), o incremento na evolução da síntese de etileno apresentada por estes frutos pode ser interpretada como uma simples resposta à baixa temperatura, ou alternativamente que o etileno induz o dano de frio em espécies sensíveis. O fato de que a aplicação de etileno induz a manifestação de injúrias de frio tanto em frutos climatéricos quanto em não-climatéricos, sustenta a hipótese de que o etileno desempenha um importante papel no processo de indução desta fisiopatia.

A associação entre o etileno e a baixa temperatura na indução do *chilling* foi estudada por Ben-Amor et al. (1999) por meio de experimentos conduzidos com melões cantalupe transformados, apresentando inibição da produção autocatalítica do etileno. De acordo com os resultados deste estudo, os autores atribuíram a maior resistência dos frutos transformados a uma menor degradação das membranas celulares, estimada pelo menor percentual de vazamento de íons, bem como a manutenção de elevada atividade de enzimas antioxidantes mesmo após o reaquecimento dos frutos. Além disso, quando os melões transformados foram tratados com etileno exógeno houve restabelecimento da sensibilidade dos frutos ao frio.

Contrariamente, em outros estudos foi verificado que o etileno protegeu os frutos cítricos das injúrias de frio por estimular a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) durante o

período de exposição à baixa temperatura (LAFUENTE et al., 2001; LAFUENTE; SALA; ZACARIAS, 2004).

Em frutos cítricos, recentes investigações têm demonstrado um possível processo de regulação da biossíntese do etileno induzido pelo *chilling* (ZACARIAS et al., 2003). Segundo o modelo proposto, a exposição dos frutos à baixa temperatura induz, em um primeiro momento, o acúmulo de ACC no tecido seguido da estimulação da atividade da ACC oxidase. Este padrão foi diretamente associado ao acúmulo de apenas um dos dois transcritos da ACC sintase identificados até o presente momento em citros e também com o acúmulo de mRNA da ACC oxidase. Além disso, foi observado que o acúmulo destes transcritos foi maior nas células do flavedo dos frutos que exibiam dano quando comparado ao tecido sadio (ZACARIAS et al., 2003).

O efeito inibitório das altas temperaturas na síntese do etileno também é relatado (YANG, 1980; LURIE; KLEIN, 1990; ANTUNES; SFAKIOTAKIS, 2000). Em situações onde os frutos foram submetidos a tratamentos térmicos, com propósitos quarentenários ou de redução do *chilling*, não apenas a síntese do etileno foi suprimida como também os frutos não responderam ao etileno exógeno (SEYMOUR et al., 1987; YANG et al., 1990). Este fato pode ser indicativo de inativação dos receptores de etileno, o que ocasiona o impedimento da transdução de sinal e ativação de respostas dependentes do etileno (LURIE, 1998; PECH; BOUZAYEN; LATCHÉ, 2008). Em vários frutos, foi observada a perda parcial da atividade da ACC oxidase após a exposição a temperaturas na faixa de 42-46°C (DUNLAP et al., 1990; PAULL; CHEN, 1990), inicialmente relacionada à diminuição do acúmulo de mRNA da ACC oxidase seguido da cessação da síntese da enzima (LURIE et al., 1996). A maioria dos estudos tem indicado que a ACC oxidase é mais sensível ao calor que a ACC sintase (KLEIN, 1989; ATTA ALY, 1992). A exposição de maçãs e tomates a temperaturas superiores a 35°C ocasiona acúmulo de ACC nos tecidos (YU et al., 1980; ATTA ALY, 1992), contudo, em ambos os frutos foi verificada reduzida síntese de etileno (BIGGS et al., 1988; KLEIN, 1989). A retomada na síntese de etileno pode ocorrer removendo-se os frutos do calor (PAULL; CHEN, 1990; CHAN, 1991), porém para que a produção de etileno seja restabelecida é necessária a síntese protéica (BIGGS et al., 1988). Confirmando essa suposição, Lurie et al. (1996) demonstram que tanto o mRNA quanto a proteína da ACC oxidase foram acumuladas no tecido de tomates após a remoção do tratamento térmico com ar a 38°C.

2.2 Experimento 1

Tratamentos térmicos retardam o desenvolvimento de injúrias de frio em lima ácida 'Tahiti'

2.2.1 Material e Métodos

Limas ácidas 'Tahiti', provenientes de um pomar comercial localizado no município de Mogi-Mirim, SP, foram colhidas com coloração verde-intensa e diâmetro médio de aproximadamente 6 centímetros. Após a colheita, os frutos foram transportados ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Pós-Colheita do Departamento de Ciências Biológicas, da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP, onde se procedeu à seleção, descartando-se frutos que apresentavam danos mecânicos e manchas na casca, em seguida foi realizada a homogeneização das amostras experimentais.

Os tratamentos térmicos consistiram da imersão pós-colheita de frutos em água, por meio de um banho-térmico marca Tecnal e da exposição de frutos ao ar, acondicionando-os em câmaras do tipo B.O.D., conforme descrito a seguir:

Tratamento 1- Armazenamento a 1°C;

Tratamento 2- Exposição dos frutos a 37°C por 10 horas e armazenamento a 1°C;

Tratamento 3- Imersão dos frutos em água a 42°C por 15 minutos e armazenamento a 1°C;

Tratamento 4- Imersão dos frutos em água a 53°C por 2 minutos e armazenamento a 1°C.

Os frutos foram acondicionados em caixas plásticas e expostos à temperatura ambiente para secar por alguns minutos após a aplicação dos tratamentos térmicos. Em seguida, as limas foram armazenadas em câmara com temperatura de 1°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) e umidade relativa do ar de 90% ($\pm 5\%$), durante 45 dias.

As medidas da respiração, síntese de etileno e incidência de injúrias de frio foram realizadas a cada 5 dias, durante 45 dias de armazenamento. Aos 15, 30 e 45 dias, parte dos frutos foi removida da refrigeração e permaneceu durante 3 dias a 20°C, quando também foi medida a respiração, síntese de etileno, índice de injúrias de frio, atividade *in vivo* da ACO e o vazamento de íons ao final de cada período. Nesta ocasião foram retiradas amostras de flavedo de cada repetição para as demais avaliações realizadas, as quais estão descritas a seguir:

- a) **Índice de injúrias de frio:** os frutos foram classificados em cinco categorias de acordo com a superfície da casca afetada (KLUGE et al., 2003): [0] sem depressões na casca; [1] 1 a 5%; [2] 5-25%; [3] 25-50%; [4] >50% da superfície afetada.
- b) **Respiração:** aproximadamente mil gramas de frutos de cada repetição foram transferidos para recipientes com volume de 1.700mL. Estes foram fechados hermeticamente durante 3 horas. Para a análise da produção de CO₂, foi injetada uma alíquota de 0,5mL de cada recipiente, em um cromatógrafo a gás, marca Thermofinigan, modelo Trace GC Ultra, equipado com detector de ionização de chama (FID) e uma coluna de aço inox de 1/8" e 4,0m de comprimento, preparada com Porapak N 50/80. Como gás de arraste, utilizou-se o hidrogênio a um fluxo de 25mL min⁻¹. A temperatura da coluna, injetor e detector foram de 110, 140 e 200°C, respectivamente. Os resultados foram expressos em mL CO₂ kg⁻¹ h⁻¹, calculados em função da concentração de CO₂ presente no recipiente, da massa de frutos, do volume livre do recipiente e do tempo de fechamento do recipiente.
- c) **Síntese de etileno:** dos mesmos recipientes usados para a mensuração da respiração retirou-se uma alíquota de 0,5mL de cada recipiente, a qual foi injetada em um cromatógrafo a gás, marca Thermofinigan, modelo Trace GC Ultra, equipado com detector de ionização de chama (FID) e uma coluna de aço inox de 1/8" e 1,8m de comprimento, preparada com Porapak N 50/80. Como gás de arraste, utilizou-se o hidrogênio a um fluxo de 25mL min⁻¹. A temperatura da coluna, injetor e detector foram de 110, 140 e 200°C, respectivamente. Os resultados foram expressos em síntese de etileno (μL C₂H₄ kg⁻¹ h⁻¹), calculada com base na concentração de etileno no interior do recipiente, na massa de frutos, no volume livre do recipiente e no tempo de fechamento do recipiente.
- d) **Atividade *in vivo* da ACC oxidase (ACO):** determinada de acordo com Dupille e Zacarias (1996). Discos de flavedo dos frutos foram lavados com água deionizada duas vezes. Após, serem secos com papel filtro, os discos (2,0g) foram incubados em solução contendo tampão fosfato de potássio 25mM (pH 6,0), manitol 0,8M e ACC 5mM. Os discos de flavedo permaneceram incubados por uma hora na referida solução e a seguir foram secos em papel filtro e imediatamente acondicionados em frascos herméticos de 40mL e incubados a 30°C. Depois de uma hora a concentração de etileno presente nos frascos foi determinada e os valores expressos em nmol C₂H₄ g⁻¹ h⁻¹.

- e) **Atividade *in vitro* da ACC oxidase (ACO, EC 1.14.17.4):** determinada de acordo com a metodologia proposta por Moya-Leòn e John (1994), com modificações. Amostras de flavedo congelado foram pulverizadas em moinho com nitrogênio líquido. A seguir, aproximadamente um grama do tecido foi homogeneizado em tampão de extração contendo Tris-HCl 100mM pH 7,5 contendo 5mM DTT; glicerol 10% (w/v); 30mM ascorbato de sódio e PVPP 4% (p/v). A seguir, o homogeneizado foi filtrado com gaze e centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C. O ensaio foi realizado incubando-se 1,0mL do sobrenadante contendo a enzima com 2,0mL da solução de reação contendo tampão tricina 0,1M pH 7,5; 0,1mM FeSO₄; 1mM ACC; 20mM NaHCO₃ e 30mM ascorbato de sódio. Após incubação da solução a 30°C em frasco hermético por 30 minutos a concentração de etileno presente nos frascos foi determinada e os valores expressos em nmol C₂H₄ g⁻¹ h⁻¹.
- f) **Conteúdo de ACC livre (ACC) e malonilado (MACC):** foi mensurado segundo o método proposto por Lizada e Yang (1979) e modificado por Fils-Lycaon et al. (2008). Amostras de flavedo congelado foram pulverizadas em moinho com nitrogênio líquido. A seguir, o tecido foi homogeneizado em etanol 70% e aquecido a 100°C por 30 minutos e em seguida filtrado com gaze. O extrato resultante foi evaporado e o resíduo resultante ressuspendido em água. O sobrenadante foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos para clarear o extrato e o ACC livre foi quimicamente transformado em etileno conforme descrito anteriormente (LIZADA; YANG, 1979). O conteúdo de MACC foi determinado em extrato hidrolisado com HCl a 100°C por uma hora e neutralizado com NaOH (HOFFMAN et al., 1982). O extrato hidrolisado foi usado para determinação do conteúdo de ACC, de acordo com Lizada e Yang (1979). A diferença entre o conteúdo de ACC antes e após a hidrólise representa o conteúdo de MACC no extrato (HOFFMAN et al., 1983). Os resultados foram expressos em nmol C₂H₄ g⁻¹ tecido.
- g) **Vazamento de íons:** foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Vieira Santos et al. (2001). Discos de flavedo dos frutos foram lavados com água deionizada duas vezes. Após, secos com papel filtro, os discos (2,0g) foram acondicionados em frascos com 50mL de solução 0,4M de manitol. Os frascos foram mantidos sob agitação moderada por 3 horas quando então, foi medida a condutividade elétrica da solução a 25°C (L_{inicial}). A solução contida nos frascos foi congelada por 18 horas e após este período foi

descongelada e novamente procedeu-se a medida da condutividade elétrica a 25°C (L_{final}). Os valores obtidos foram calculados por meio da fórmula $VI = (L_{\text{final}} - L_{\text{inicial}}) / L_{\text{final}} \times 100$ e expressos em condutividade relativa.

- h) Peroxidação lipídica:** foi determinada pela medição da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito previamente (BUEGE; AUST, 1978; DHINDSA; MATOWE, 1981). Um grama de tecido foi triturado em nitrogênio líquido e, posteriormente, homogeneizado em 5mL de ácido tricloroacético (TCA) (0,1%) juntamente com 20% de PVPP. Após completa homogeneização, o material foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos. Do sobrenadante foi retirado uma alíquota de 1,0mL a qual se adicionou 4mL de TCA (20%) contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico (TBA). A mistura foi aquecida a 95°C por 30 minutos, e rapidamente resfriada em banho de gelo. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 10.000 x g por 10 minutos para clarear o extrato e imediatamente a absorbância das TBARS formadas foi determinada em espectrofotômetro a 535nm. As medidas foram corrigidas para turbidez inespecífica pela subtração da absorbância a 600nm. A concentração das TBARS foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 155mM cm^{-1} .
- i) Peróxido de hidrogênio (H_2O_2):** o conteúdo de peróxido de hidrogênio no flavedo foi determinado de acordo com o método proposto por Gay et al. (1999) e Hermes-Lima et al. (1995), com modificações. Um grama de flavedo foi triturado em nitrogênio líquido e posteriormente, homogeneizado em 10mL de metanol a 0°C. Após a completa homogeneização as amostras foram centrifugadas 10.000 x g por 10 minutos. A seguir retirou-se uma alíquota de 35 μL do sobrenadante, à qual se adicionou 500 μL de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ 1mM e 200 μL de H_2SO_4 250mM. A mistura permaneceu em reação por 5 minutos no escuro. Em seguida adicionou-se 100 μL de xilenol laranja 1mM e a mistura foi mantida no escuro por 20 minutos quando então procedeu-se à leitura da absorbância das amostras a 560nm. As leituras foram comparadas com uma curva padrão com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio.
- j) Radicais superóxido (O_2^-):** o conteúdo de radicais superóxido foi medido espectrofotometricamente a 490nm pela oxidação da epinefrina a adrenocromo (MISRA; FRIDOVICH, 1972; MINIBAYEVA; BECKETT, 2001). A reação consistiu da adição de 100 μL de extrato vegetal a 3,0mL de água pH 7,0 e 1mM epinefrina. Após a incubação

sob agitação moderada por 20 minutos no escuro a reação foi parada adicionando-se 50 μ L de HCl 0,05N. Imediatamente procedeu-se à leitura da absorbância a 490nm. O conteúdo de radicais superóxido na casca foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar de 4,47mM cm⁻¹.

- k) Extração protéica:** em cada período de avaliação, amostras do flavedo de frutos de cada tratamento foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -30°C até o momento das análises. Aproximadamente um grama do flavedo congelado foi pulverizado em moinho com nitrogênio líquido. A seguir o tecido vegetal foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 100mM, pH 7,5, contendo 1mM de EDTA, 3mM de DTT e 4% (p/v) de PVPP. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e estocado em freezer a -30°C até o momento das análises.
- l) Atividade de superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1):** a atividade da SOD foi observada por meio de gel de poliacrilamida 12% não desnaturante (PAGE), conforme descrito em VITÓRIA et al. (2001). Cada gel permaneceu sob corrente elétrica de 20mA por aproximadamente 4 horas. Após a separação das proteínas, os géis foram enxaguados rapidamente em água destilada-deionizada e incubados durante 30 minutos no escuro à temperatura ambiente em uma solução contendo 50mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 1mM EDTA, 0,05mM riboflavina, 0,1mM NBT e 3% TEMED. Ao final de 30 minutos, a mistura de reação foi removida, os géis enxaguados com água destilada-deionizada e colocados sob iluminação por alguns minutos para foto-oxidação das bandas. Para cada gel foram utilizados 7 μ L de SOD bovina (Sigma) como padrão.
- m) Atividade de catalase (CAT, EC 1.11.1.6):** determinada conforme Azevedo et al. (1998), pela decomposição do peróxido de hidrogênio a 240nm durante 1 minuto em uma reação contendo tampão fosfato de potássio 100mM pH7,5 e 2,5 μ L de peróxido de hidrogênio (30%). A reação foi iniciada pela adição de 15 μ L de extrato protéico.
- n) Atividade de ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11):** foi determinada através do método descrito em Nakano e Asada (1981). A mistura da reação consistiu de 650 μ L de tampão fosfato de potássio 80mM pH 7,0; 100 μ L ascorbato (5mM); 100 μ L EDTA (1mM); 100 μ L H₂O₂ (1mM) e 20 μ L de extrato. A atividade foi determinada pela degradação do peróxido de hidrogênio durante 1 minuto, por alterações na absorbância a 290nm. A mistura de reação contendo tampão fosfato, ascorbato e EDTA permaneceu em banho-

maria a 30°C. O peróxido de hidrogênio foi adicionado somente no início da leitura em espectrofotômetro.

- o) Atividade de glutathione redutase (GR, EC 1.6.4.2):** foi determinada espectrofotometricamente a 30°C, em uma mistura de reação, contendo tampão fosfato de potássio 100mM, pH 7,5, 1mM 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), 1mM glutathione oxidada (GSSG) e 0,1mM NADPH. A reação foi iniciada pela adição de 10µL de extrato. A GR foi estimada pela redução da glutathione oxidada, monitorada pela alteração da absorvância a 412nm (SMITH et al., 1988).
- p) Proteínas totais:** a concentração de proteínas foi determinada em espectrofotômetro a 595nm de acordo com Bradford (1976), utilizando-se o BSA como padrão.

2.2.2 Delineamento experimental e análise dos dados

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições de 10 frutos. Para as análises bioquímicas foram usadas triplicatas de cada repetição. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e, havendo diferenças, as médias foram comparadas pelo teste LSD (*Least Significant Difference*) a 5% de probabilidade de erro.

Os procedimentos estatísticos foram executados com auxílio do pacote estatístico SOC (Software Científico:NTIA/EMBRAPA).

2.2.3 Resultados e Discussão

Assim como observado anteriormente em outros frutos de origem tropical, a exposição da lima ácida ‘Tahiti’ por período prolongado abaixo da temperatura mínima de segurança de 8°C induz o desenvolvimento e exteriorização de injúrias de frio nos frutos (LYONS, 1973).

A partir de 10 dias de exposição da lima ácida a 1°C, os sintomas de *chilling* tornaram-se visíveis e aumentaram gradualmente durante o armazenamento refrigerado (Figura 1A). Após a interrupção da refrigeração seguida da exposição dos frutos a 20°C por 3 dias, simulando o período de comercialização, os sintomas foram intensificados e tornaram-se mais severos à medida que o armazenamento foi prolongado, conforme também verificado por PARKIN et al. (1989). No presente trabalho, verificou-se que o tratamento térmico dos frutos por imersão em água (42°C por 15 minutos ou 53°C por 3 minutos) retardou o desenvolvimento dos sintomas de *chilling* no flavedo dos frutos aos 30 e 45 dias, mesmo após a exposição a 20°C durante 3 dias (Figura 1B). Esses resultados suportam relatos anteriores de que os tratamentos térmicos com água quente promovem maior resistência aos frutos cítricos contra as injúrias de frio (RODOV et al., 1995; PORAT et al., 2000; SCHIRRA et al., 2004; GHASEMNEZHAD et al., 2008). Por outro lado, aos 30+3 dias e principalmente aos 45+3 dias de armazenamento, houve significativo acréscimo no índice de injúrias de frio nos frutos controle e nos condicionados a 37°C por 10 horas antes do armazenamento refrigerado.

Embora estudos realizados anteriormente relatem a eficácia do condicionamento prévio de frutos durante períodos variados de tempo a temperaturas moderadas, antes da exposição a temperaturas indutoras de *chilling* (MULAS; LAFUENTE; ZACARIAS, 1995; SALA; LAFUENTE, 2000; RIVERA et al., 2007), neste estudo o condicionamento térmico dos frutos a 37°C por 10 horas antecipou e intensificou os sintomas das injúrias de frio, resultando em índices superiores aos observados no controle, ao final do armazenamento.

Possivelmente esses resultados sejam devido ao fato de que, neste estudo, os frutos foram analisados após permanecerem por 3 dias a 20°C, enquanto nos estudos relatados anteriormente, os frutos foram analisados ainda durante a refrigeração. Além disso, o tempo de exposição ao condicionamento térmico também pode ter sido insuficiente para induzir tolerância ao frio, considerando que, no caso de tangerinas ‘Fortune’, os frutos foram condicionados a 37°C por 3 dias (SALA; LAFUENTE, 2000).

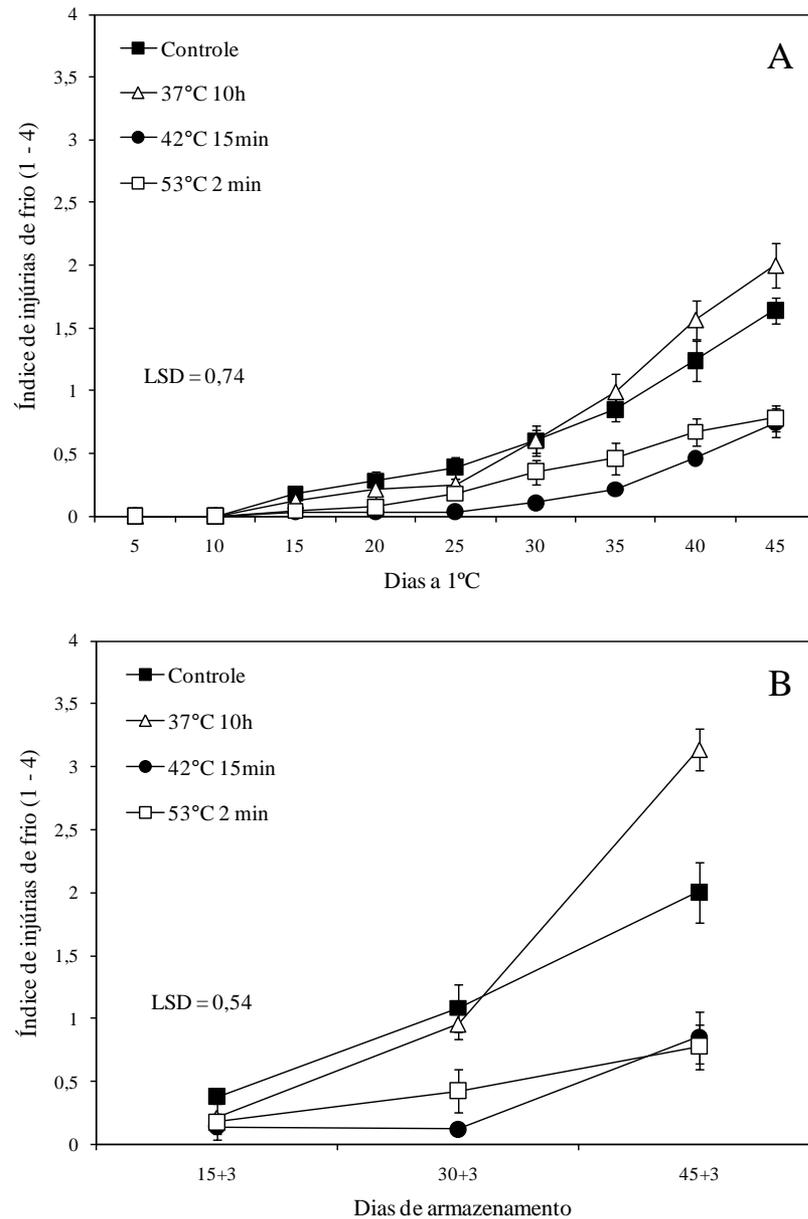


Figura 1 - Índice de injúrias de frio em lima ácida 'Tahiti' durante o armazenamento a 1°C (A) e após a remoção dos frutos da refrigeração aos 15, 30 e 45 dias seguida de 3 dias a 20°C (B). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD ($p < 0,05$). Índice de injúrias de frio: 0 = sem depressões; 1 = 1 a 5%; 2 = 5-25%; e 3 = 25-50%; 4 = >50% da superfície afetada

A inicialização das injúrias decorrentes da ação do frio nos tecidos vegetais antecede a exteriorização visual dos sintomas (LYONS, 1973), e é influenciada por uma variada e complexa rede de eventos bioquímicos e fisiológicos que ocorrem de maneira organizada e resultam em uma resposta celular frente à situação de estresse. Acréscimos na atividade respiratória e na síntese de etileno podem ser indicativos de dano de *chilling* mesmo em frutos aparentemente sem danos visuais (SCHIRRA, 1992). Nesse estudo, a atividade respiratória e a síntese de etileno permaneceram baixas e não diferiram entre os tratamentos durante todo o período de armazenamento a 1°C (Figuras 2A e 3A). Com a exposição dos frutos a 20°C a atividade respiratória e a síntese de etileno foram intensificadas, porém não foram verificadas diferenças aos 15+3 e aos 30+3 dias entre os frutos tratados termicamente em relação ao controle. Por outro lado, enquanto a respiração e a síntese de etileno dos frutos tratados com água a 42°C ou 53°C sofreram leve acréscimo aos 45+3 dias, no controle e nos frutos condicionados a 37°C por 10 horas a taxa de produção destes gases foi significativamente intensificada e permaneceu maior que a verificada nos frutos tratados termicamente (Figuras 2B e 3B).

Normalmente, a intensificação da respiração é acompanhada por uma maior demanda de energia pelas células (SEMIKHATOVA, 1995) e essa resposta pode estar relacionada a mudanças estruturais e funcionais no aparato mitocondrial (KISLYUK; MIROSLAVOV; PALEEVA, 1995; ZYKOVA; KOLESNICHENKO; VOINIKOV, 2002) em resposta ao estresse por baixa temperatura, principalmente após o reaquecimento dos frutos. Além disso, em determinados frutos, o estímulo a síntese de etileno em resposta à baixa temperatura ocorre paralelamente ao desenvolvimento dos sintomas de *chilling* e esses eventos têm sido relacionados ao aumento nos precursores da biossíntese do etileno ou a atividade das enzimas implicadas nesse processo (CONCELLÓN; AÑÓN; CHAVES, 2005; LEDERMAN et al., 1997).

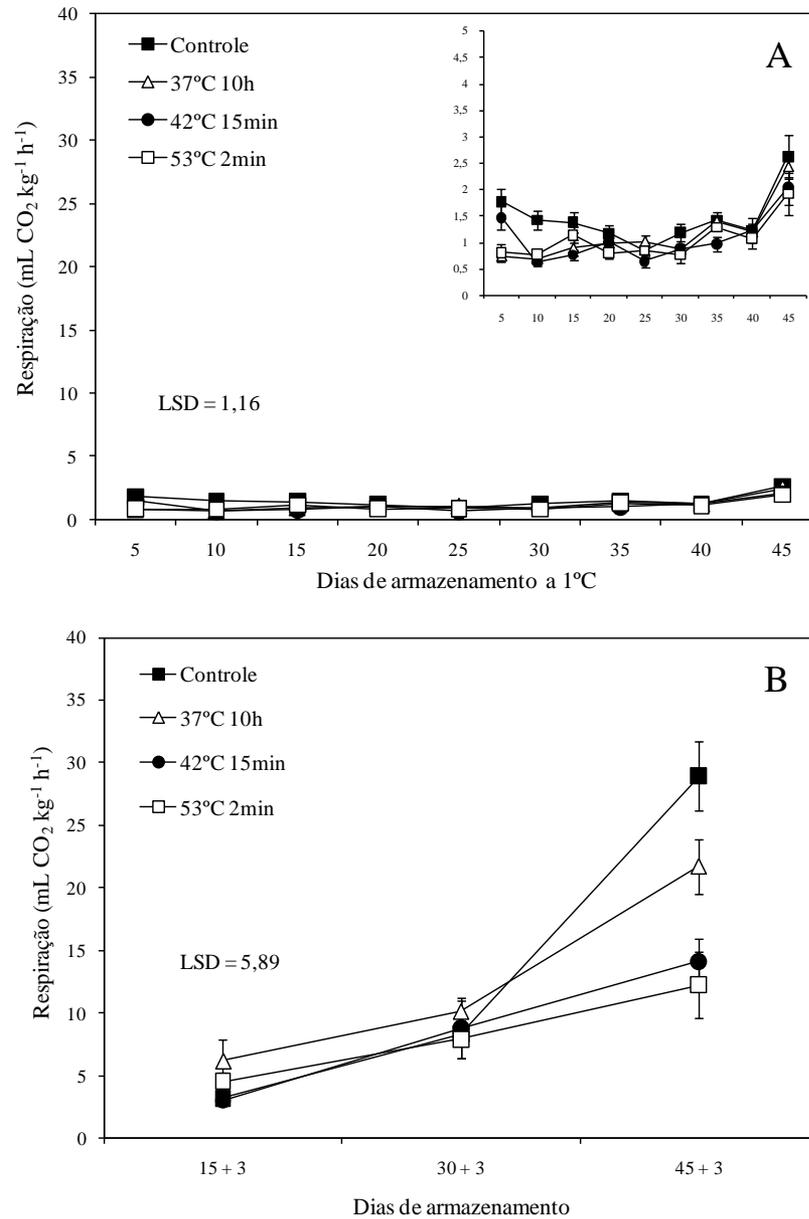


Figura 2 – Atividade respiratória da lima ácida ‘Tahiti’ durante o armazenamento a 1°C (A) e após a remoção dos frutos da refrigeração aos 15, 30 e 45 dias seguida de 3 dias a 20°C (B). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD (p<0,05)

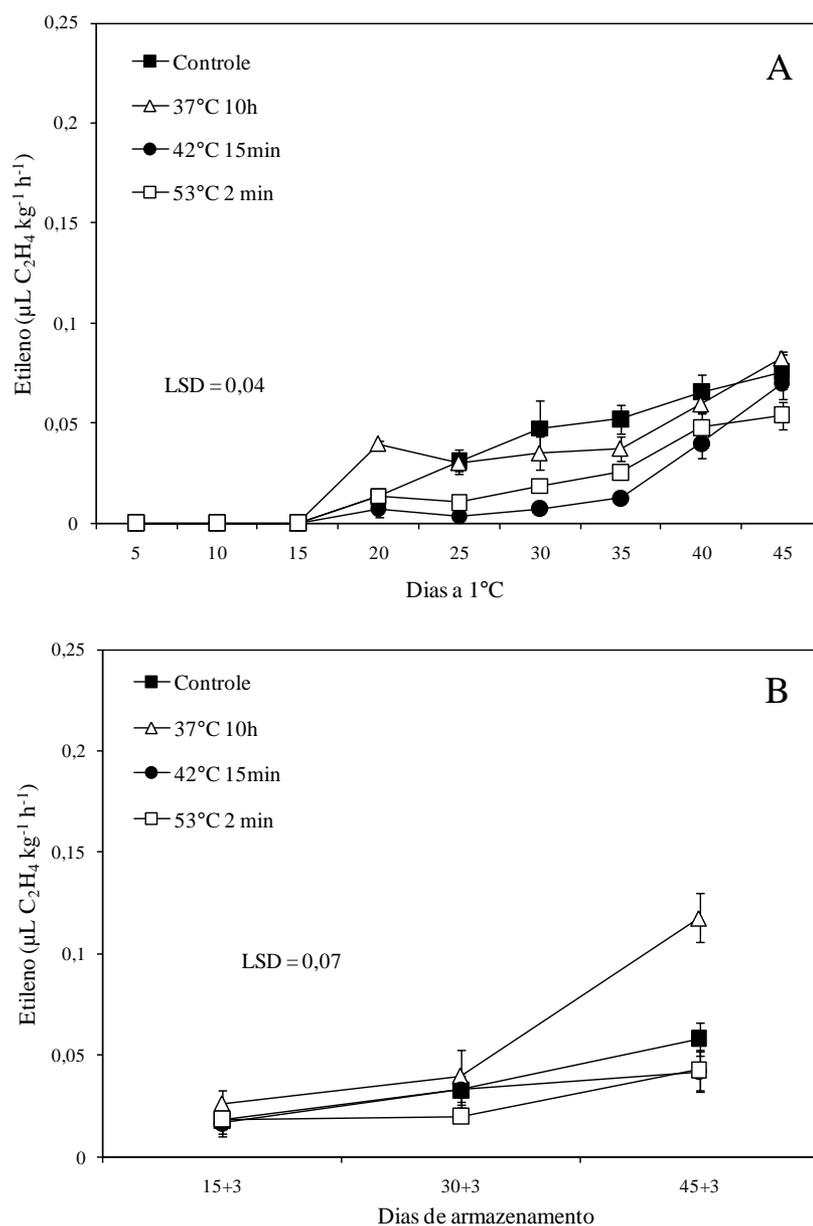


Figura 3 - Síntese de etileno durante o armazenamento da lima ácida ‘Tahiti’ a 1°C (A) e após a remoção dos frutos da refrigeração aos 15, 30 e 45 dias seguida de 3 dias a 20°C (B). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD ($p < 0,05$)

De modo geral, nesse estudo, pode-se inferir que o padrão respiratório e de síntese do etileno exibido pelos frutos após a refrigeração, correlacionou-se positivamente com o desenvolvimento dos sintomas de injúrias de frio (Figuras 2B e 3B). Dessa forma, a supressão da

evolução na síntese de etileno e respiração dos frutos mediante a aplicação de tratamentos térmicos moderados resultou em menor índice de injúrias de frio nos frutos, confirmando os resultados obtidos anteriormente por Ghasemnezhad et al. (2008).

O possível papel desempenhado pelo etileno no desenvolvimento dos sintomas de *chilling* tem demonstrado ser complexo, e constitui um assunto controverso na literatura devido ao fato de sua presença poder aliviar ou intensificar os sintomas em diferentes tipos de frutos (WANG, 1993; PORAT et al., 1999; SELVARAJAH; BAUCHOT; JOHN, 2001). Desta forma, a síntese e o metabolismo do etileno foram avaliados de modo a obter uma melhor compreensão do seu papel nesse processo.

A atividade *in vivo* da ACO, estimada pela capacidade do flavedo converter ACC exógeno em etileno foi significativamente afetada durante os primeiros dois terços do armazenamento nos frutos submetidos ao condicionamento a 37°C ou ao tratamento térmico de 42°C por 15 minutos e 53°C por 2 minutos (Figura 4A). Ao final do armazenamento, a atividade *in vivo* da ACO foi intensificada no flavedo dos frutos condicionados a 37°C e nos imersos em água a 42°C por 15 minutos. Em contraste, nos frutos imersos em água a 53°C por 2 minutos a atividade da ACO permaneceu significativamente menor.

Quando avaliada a atividade *in vitro* da ACO, foram verificadas algumas similaridades e outras importantes diferenças em relação ao padrão apresentado no ensaio *in vivo* durante o mesmo período avaliado. A atividade *in vitro* da ACO aos 15+3 dias permaneceu praticamente semelhante à observada no flavedo dos frutos na colheita, contudo nesse período a atividade observada no controle e no flavedo dos frutos condicionados a 37°C foi levemente superior a observada nos frutos tratados termicamente (Figuras 4B). Nas avaliações realizadas nos períodos subsequentes (30 e 45 dias + 3 dias a 20°C) essa diferença aumentou e a atividade da ACO manteve-se cerca de duas vezes maior que a observada no flavedo dos frutos submetidos a 42°C por 15 minutos ou 53°C por 2 minutos. Em geral, mesmo após a exposição dos frutos por 3 dias a 20°C aos 15, 30 e 45 dias, verificou-se que a atividade da ACO *in vitro* foi sempre inferior ao controle e aos frutos condicionados, e permaneceu praticamente semelhante à atividade observada na colheita. Esses resultados podem justificar a baixa síntese de etileno observada nos frutos tratados termicamente mesmo aos 15+3 dias quando o conteúdo de ACC livre no tecido era alto se comparado aos outros tratamentos (Figuras 3B e 5A). Isso indica claramente que o passo limitante

à produção de etileno, nesse caso, foi a conversão do ACC em etileno e não a síntese do ACC mediante ação da sintase (ACS).

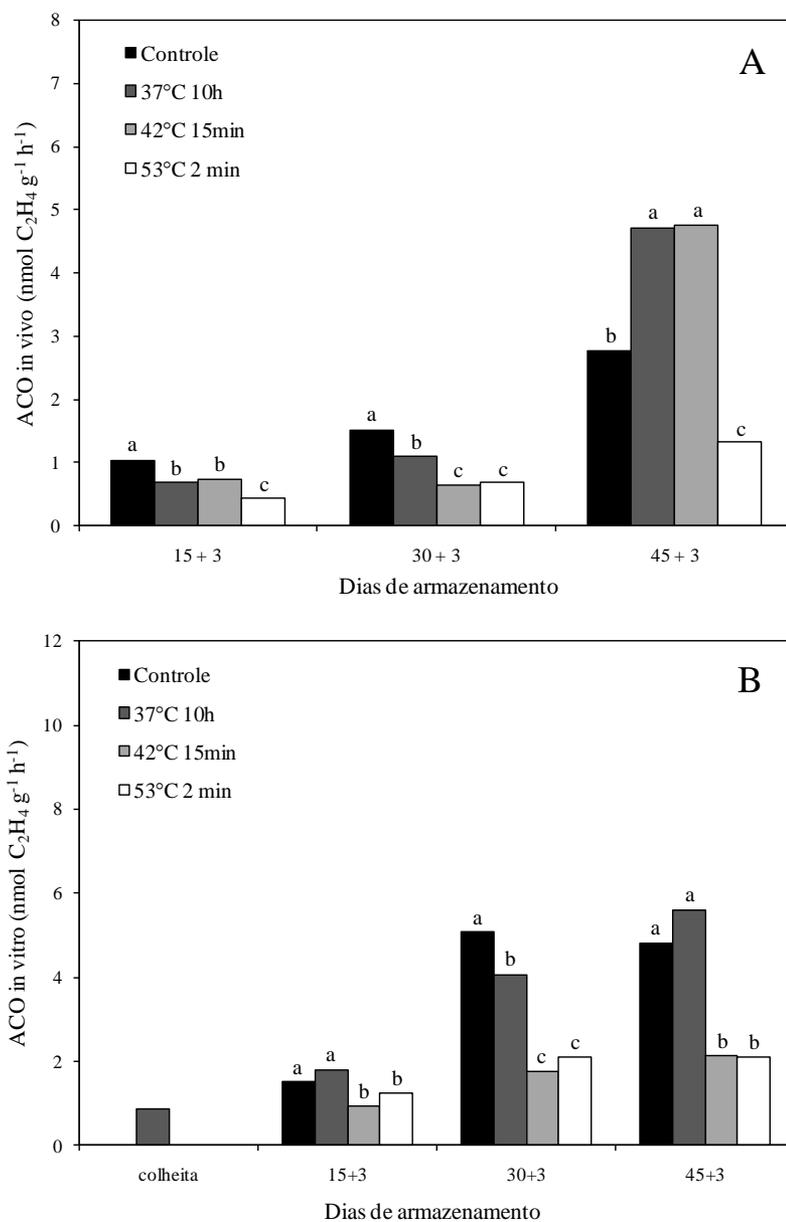


Figura 4 - Atividade *in vivo* (A) e *in vitro* (B) da ACO no flavedo da lima ácida ‘Tahiti’ após 15, 30 e 45 dias a 1°C seguida de 3 dias a 20°C. Tratamentos seguidos pela mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$)

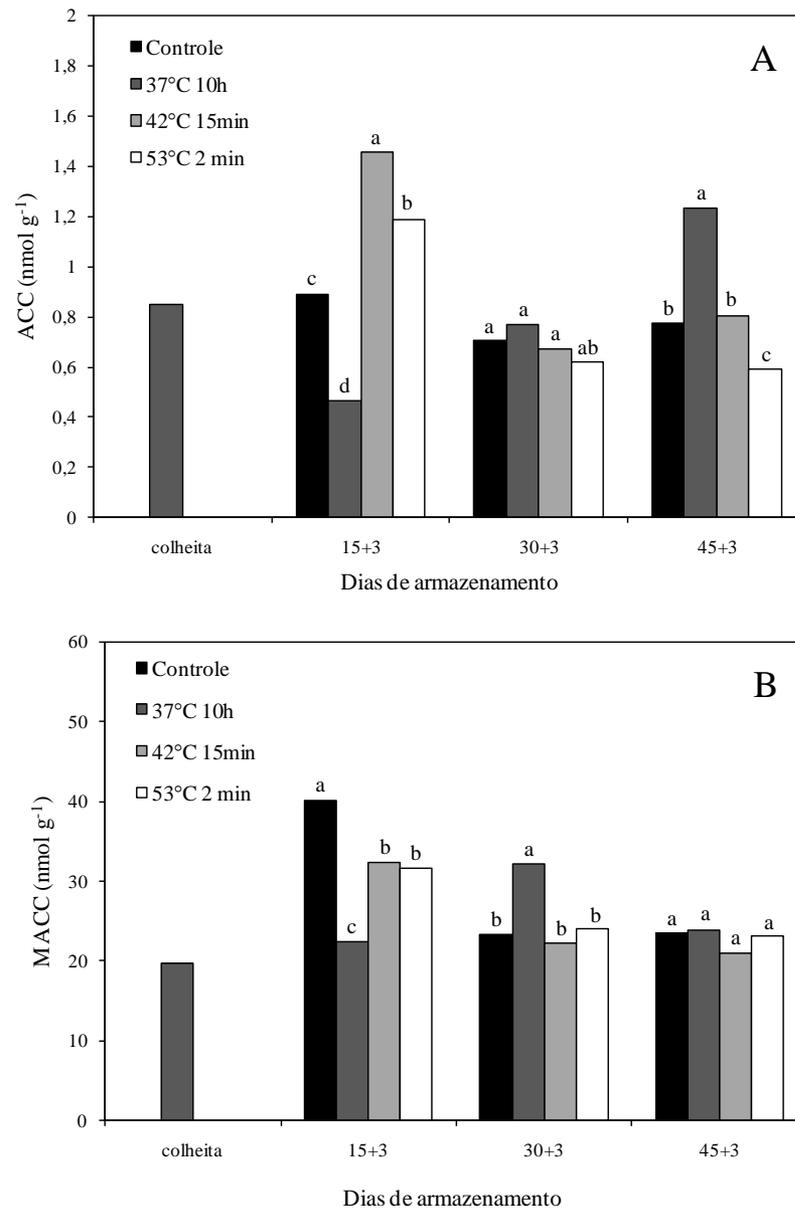


Figura 5 – Conteúdo de ACC livre (A) e malonilado (B) no flavedo da lima ácida ‘Tahiti’ na colheita e após 15, 30 e 45 dias a 1°C seguido de 3 dias a 20°C. Tratamentos seguidos pela mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$)

O efeito inibitório do calor na biossíntese de etileno tem sido relatado (YANG, 1980; ANTUNES; SFAKIOTAKIS, 2000). Em vários frutos foi observada a perda parcial da atividade da ACO após a exposição a temperaturas na faixa de 42-46°C (DUNLAP et al., 1990; PAULL;

CHEN, 1990) devido, primeiramente, à diminuição da síntese desta enzima (LURIE et al., 1996). A retomada da produção do etileno pode ocorrer removendo-se os frutos do calor (PAULL; CHEN, 1990; CHAN, 1991), porém, para que a produção do etileno seja restabelecida é necessária a síntese protéica (BIGGS et al., 1988).

Aparentemente, a atividade da ACS foi afetada pelo condicionamento dos frutos por 10 horas a 37°C, o que justificaria o baixo conteúdo de ACC no tecido aos 15+3 dias (Figura 5A). Além disso, o acréscimo no conteúdo de ACC nesses frutos aos 30+3 e aos 45+3 dias, possivelmente seja devido à síntese *de novo* da ACS (BIGGS et al., 1988) necessária para promover o progressivo acúmulo de ACC no tecido e o *burst* de etileno somente aos 45+3 dias e não aos 30+3, quando a ACO *in vitro* estava alta. Assim sendo, a evolução na síntese de etileno evidenciada aos 45+3 dias nos frutos condicionados a 37°C pode ser justificada pelo maior conteúdo de ACC livre no tecido, alta atividade da ACO *in vivo* e *in vitro* e baixo conteúdo de ACC malonilado (Figuras 3B, 4A, 4B, 5A e 5B). Por outro lado, a ausência de elevação na síntese de etileno aos 30+3 dias nos frutos condicionados a 37°C por 10 horas pode ser em parte, resultante do maior conteúdo de ACC malonilado e ao baixo conteúdo de ACC livre no tecido, se comparado aos referidos conteúdos presentes no flavedo ao final do armazenamento.

Tem sido postulado, por vários pesquisadores, que o evento inicial que desencadeia o desenvolvimento do *chilling* em tecido vegetais ocorre em nível de membrana, e que esse evento seja devido à ação de radicais livres como o O_2^- , H_2O_2 e OH^- (MARANGONI; PALMA; STANLEY, 1996; SALA, 1998). O acúmulo destas espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ocasionar danos aos lipídios das membranas formando produtos tóxicos, como o malondialdeído (MDA), um dos principais produtos da peroxidação lipídica, que pode ser mensurado por meio da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O acúmulo no tecido de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) tem sido amplamente usado como índice de peroxidação lipídica e também como indicador de estresse oxidativo (QUEIROZ et al., 1998; HODGES et al., 1999). Adicionalmente ao conteúdo de TBARS, o percentual de vazamento de íons do flavedo também foi usado como indicador da permeabilidade das membranas celulares presentes no flavedo da lima ácida (KING; LUDFORD, 1983; SALTVEIT, 2002).

O percentual de vazamento de íons do flavedo dos frutos sofreu pequeno incremento ao longo do armazenamento, atingindo valores próximos a 25% aos 45+3 dias (Figura 6A). Embora a variação entre tratamentos tenha sido pequena nas avaliações realizadas, verificou-se que, ao final

do armazenamento, o percentual de vazamento de íons nos frutos tratados termicamente foi levemente inferior ao observado no controle e no flavedo dos frutos condicionados a 37°C.

Com relação à peroxidação lipídica, verificou-se um pequeno acréscimo no conteúdo acumulado de TBARS aos 15+3 dias em relação ao conteúdo observado na colheita, contudo em nenhuma das avaliações foram observadas diferenças entre tratamentos (Figura 6B).

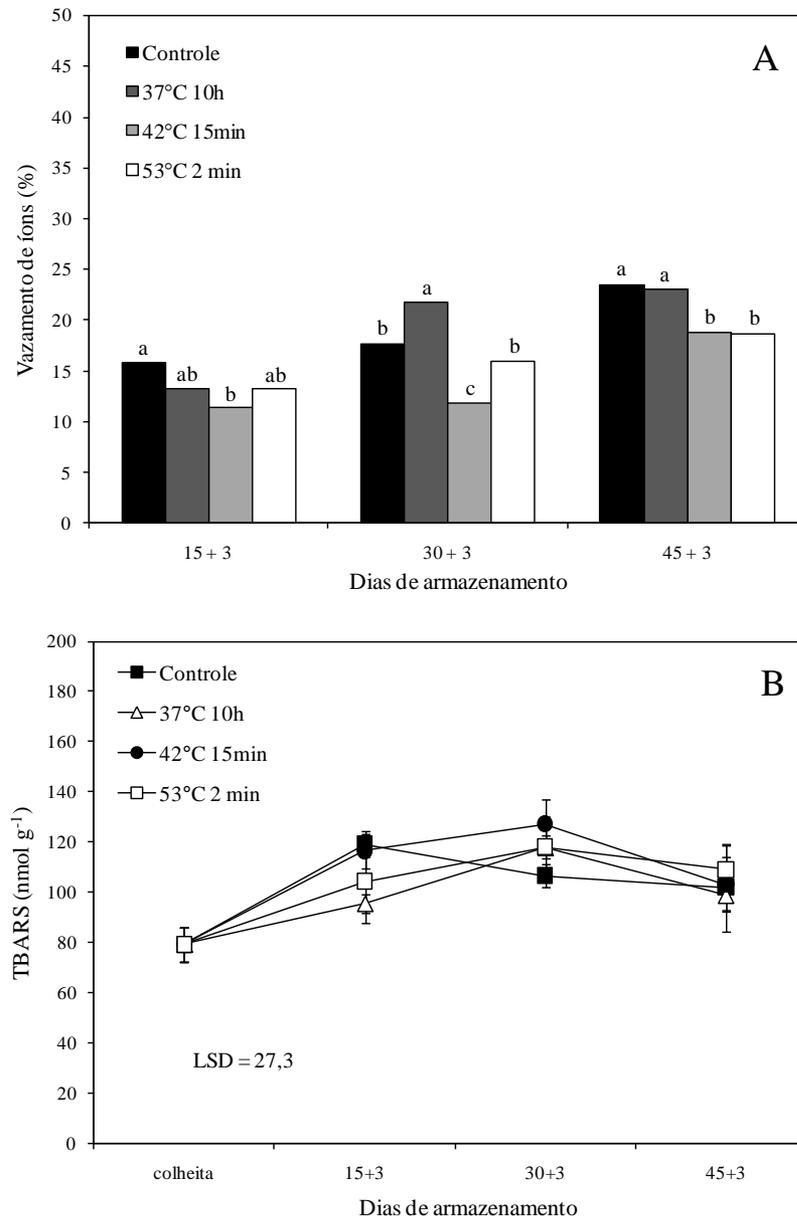


Figura 6 – Vazamento de íons (A) e conteúdo de TBARS (B) no flavedo da lima ácida ‘Tahiti’ após 15, 30 e 45 dias a 1°C seguido de 3 dias a 20°C. Em (A) tratamentos seguidos pela mesma letra, em cada período, não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$). Em (B) as barras verticais indicam o erro padrão ($n=4$)

Trabalhando com limas 'Persas', Rivera et al. (2004) não observaram diferenças na peroxidação de lipídios entre frutos armazenados a 4, 8 e 13°C, embora nos frutos armazenados a 4°C o dano de frio tenha sido superior ao verificado a 8°C e inexistente a 13°C. Segundo estes autores, a possível ausência de relação entre a peroxidação lipídica e o dano de frio está no fato de que o estresse oxidativo é intensificado apenas quando os frutos são removidos da refrigeração para a temperatura ambiente (SARUYANA; TANIDA, 1995). Em plântulas de pepino, Hariyadi e Parkin (1991) relataram que houve intensificação do processo de peroxidação somente após o reaquecimento das plântulas e não durante a refrigeração. Dessa forma, a possível explicação para os resultados obtidos nesse experimento é de que, mesmo após o reaquecimento dos frutos, não houve significativa alteração na integridade das membranas celulares frente ao estresse desencadeado pela baixa temperatura.

Em experimentos preliminares realizados em anos anteriores com limas 'Tahiti', foi verificado que tanto a incidência de injúrias de frio quanto o vazamento de íons foram mais elevados se comparados aos valores apresentados neste estudo (dados não apresentados). Além disso, o vazamento de íons havia apresentado positiva relação com o índice de injúrias de frio no flavedo dos frutos. Dessa forma, embora os frutos tenham sido coletados no mesmo pomar para todos os experimentos realizados ao longo de três anos, a diferença observada na susceptibilidade às injúrias de frio foi evidente e pode estar relacionada a fatores climáticos que tenham ocorrido no período e contribuído para uma maior tolerância pré-adquirida a campo (FERGUSON; VOLZ; WOOLF, 1999; WOOLF; BOWEN; FERGUSON, 1999).

Em resposta ao estresse promovido pela baixa temperatura houve acréscimo na produção de radicais superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no flavedo dos frutos (Figura 7A e B). O conteúdo de O_2^- permaneceu levemente superior no flavedo dos frutos controle e nos condicionados a 37°C por 10 horas. Todavia, essas diferenças não foram estatisticamente significativas quando comparadas ao conteúdo verificado no flavedo dos frutos tratados termicamente. Por outro lado, houve maior acúmulo de H_2O_2 aos 15 e 45 dias (+ 3 dias a 20°C) no flavedo do controle e dos frutos submetidos a 37°C por 10 horas.

A exposição dos frutos à temperatura de 20°C durante três dias, aos 15, 30 e 45 dias de armazenamento ocasionou elevação no conteúdo de H_2O_2 em todos os tratamentos, porém nos frutos submetidos a 42°C ou 53°C durante 15 e 2 minutos, respectivamente, o conteúdo acumulado foi menor em relação aos demais tratamentos.

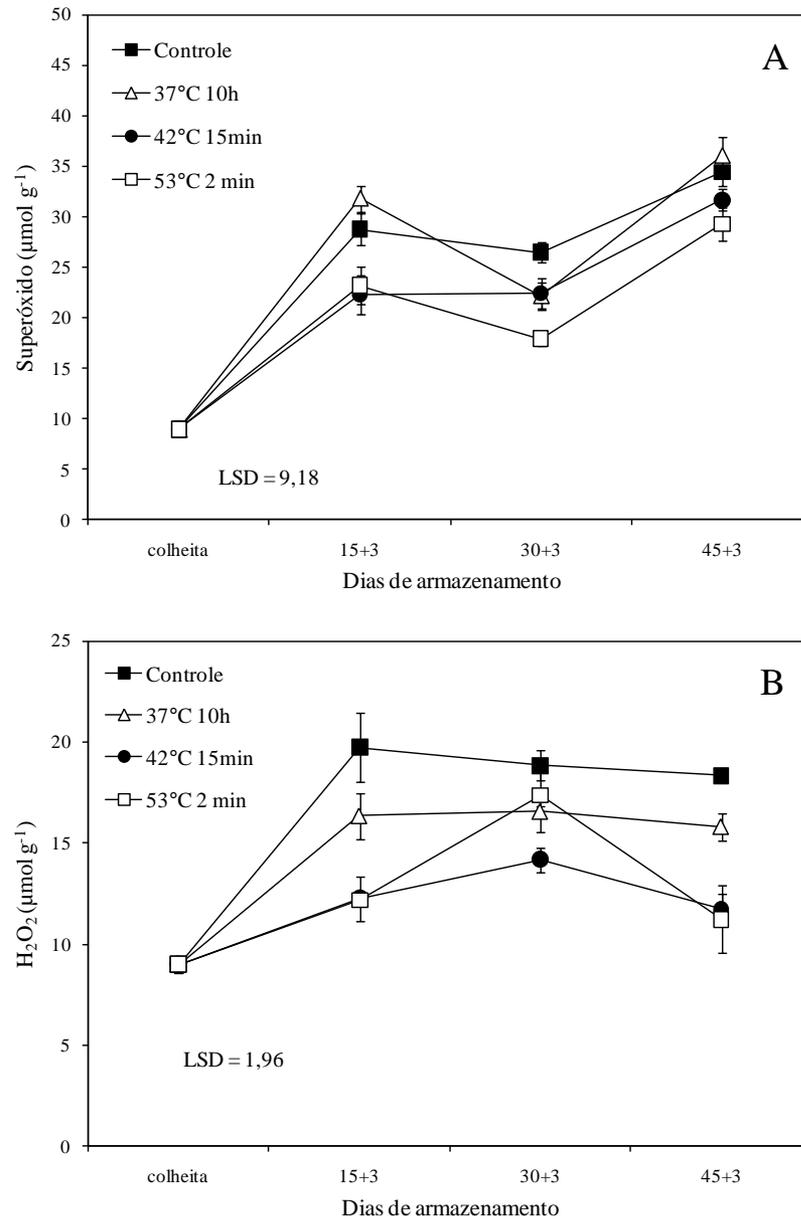


Figura 7 – Conteúdo de radicais superóxido (A) e peróxido de hidrogênio (B) no flavedo da lima ácida ‘Tahiti’ na colheita e após 15, 30 e 45 dias a 1°C seguido de 3 dias a 20°C (B). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD ($p < 0,05$)

O acúmulo de EROs nos tecidos vegetais é dependente do balanço entre a geração e a capacidade de remoção (HODGES et al., 2004). Normalmente, a baixa temperatura altera esse equilíbrio em favor da geração de radicais livres tornando crucial a ação do sistema antioxidante, de modo a evitar a intensificação da geração do O_2^- e do H_2O_2 , os quais podem ser potencialmente danosos ao metabolismo celular (MITTLER, 2002).

A dismutação do O_2^- pela SOD representa a primeira linha de defesa celular frente ao estresse oxidativo (ALSHER; ERTURK; HEATH, 2002). A atividade da SOD em PAGE não desnaturante revelou a existência de sete isoformas no flavedo da lima ácida 'Tahiti' (Figura 8). As isoformas I e IV exibiram a maior intensidade de bandas aos 30+3 dias e foram responsáveis, em maior extensão, pela atividade total da SOD no flavedo da lima ácida exposta ao frio. Em contraste, no mesmo período foi verificada a menor intensidade destas bandas nos frutos controle. As isoformas II e III foram observadas por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida apenas aos 15+3 dias. Com exceção do tratamento controle aos 30+3 dias, as isoformas V, VI e VII foram observadas nos demais tratamentos em ambas as determinações e exibiram maior e menor intensidade das bandas aos 30 e 45 dias (+3 dias a 20°C), respectivamente.

Embora não tenha sido realizada análise densitométrica nas bandas, pode-se inferir que a atividade conjunta das isoformas, principalmente durante os primeiros 30+3 dias, foi preponderante para a remoção do conteúdo de superóxido presente no flavedo dos frutos.

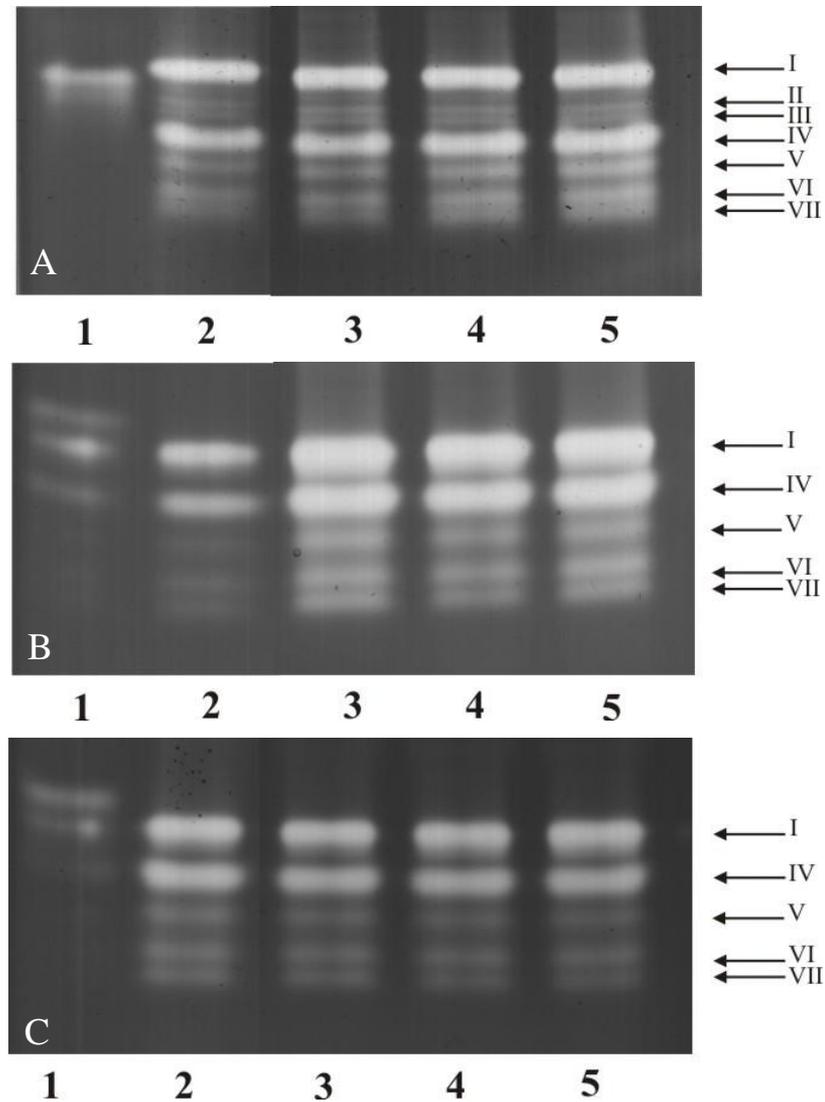


Figura 8 - Atividade da superóxido dismutase em gel de poliacrilamida não desnaturante aos 15 (A), 30 (B) e 45 (C) dias a 1°C (+3 dias a 20°C). (1) padrão de SOD bovina, (2) controle, (3) 37°C por 10 horas, (4) 42°C por 15 minutos e (5) 53°C por 2 minutos. As setas laterais representam as isoformas de SOD presentes no flavedo dos frutos

Neste trabalho, a atividade específica da catalase (CAT) presente no flavedo dos frutos controle não foi significativamente alterada ao longo do armazenamento, permanecendo baixa e praticamente similar a atividade exibida na colheita (Figura 9). De modo geral, nos demais tratamentos a atividade da CAT exibiu pequeno acréscimo em relação ao controle, porém apenas o tratamento térmico de 42°C por 15 minutos possibilitou ao final do armazenamento a manutenção da atividade entorno de 1,5 vezes maior que a observada nos demais tratamentos.

Estudos realizados anteriormente indicaram que a capacidade de remoção do H₂O₂ gerado pela ação da SOD requer a atuação conjunta da CAT, ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR), de modo a evitar o acúmulo do peróxido de hidrogênio nos tecidos (FOYER et al., 1994; SALA, 1998). Desta forma, tem sido postulado que a modulação do sistema antioxidante por meio de tratamentos térmicos pode induzir resistência ao dano de frio (SALA, 1998).

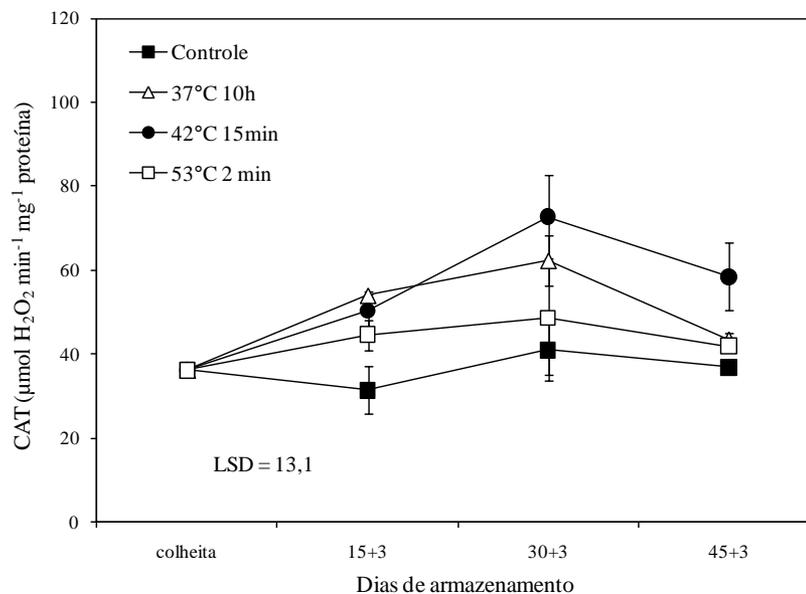


Figura 9 – Atividade específica da catalase (CAT) no flavedo da lima ácida ‘Tahiti’ na colheita e após 15, 30 e 45 dias a 1°C seguida de 3 dias a 20°C. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD (p<0,05)

A atividade específica da APX no flavedo da lima ácida foi similar entre os tratamentos após 15 dias a 1°C mais 3 dias a 20°C. Contudo, enquanto a atividade permaneceu constante (controle) ou decresceu (37°C), nos frutos tratados termicamente a atividade aumentou e ao final do armazenamento foi cerca de 2,2 vezes superior aos frutos condicionados e 1,4 vezes maior que no controle (Figura 10).

Após a remoção dos frutos da refrigeração aos 15 e 30 dias, verificou-se que nos frutos submetidos aos tratamentos com calor houve manutenção da atividade da GR em níveis significativamente superiores aos verificados no flavedo do controle. Todavia, ao final do experimento, a atividade da GR foi semelhante entre os frutos tratados e o controle (Figura 11).

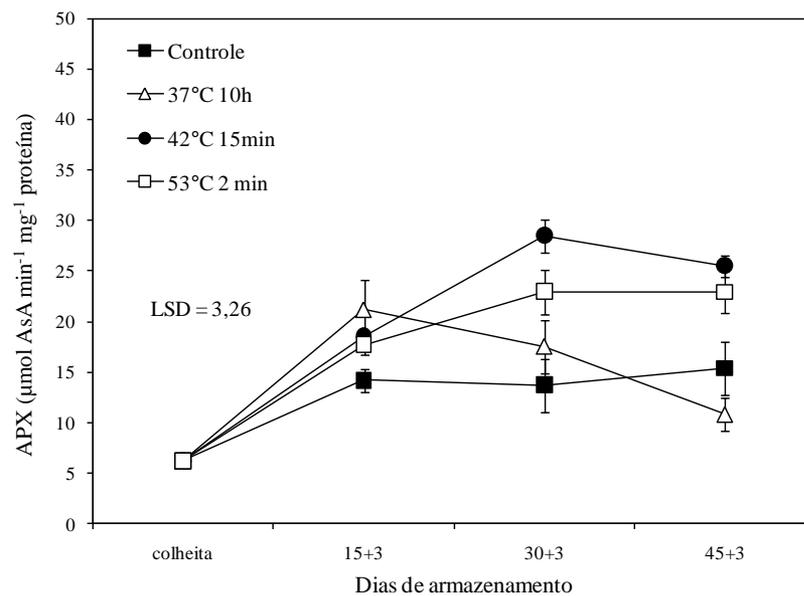


Figura 10 - Atividade específica da ascorbato peroxidase (APX) no flavedo da lima ácida 'Tahiti' na colheita e após 15, 30 e 45 dias a 1°C seguida de 3 dias a 20°C. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD (p<0,05)

Em tangerinas ‘Fortune’ a maior tolerância ao dano de frio foi associada a maior capacidade de remoção do H_2O_2 pelos frutos tratados termicamente (MARTÍNEZ-TÉLLEZ; LAFUENTE, 1997). Sala (1998) concluiu que a principal diferença entre cultivares sensíveis e tolerantes de tangerina frente ao dano de frio reside na superior capacidade do flavedo dos frutos das cultivares tolerantes em metabolizar o H_2O_2 mediante ação conjunta da SOD, CAT, APX e GR. Os resultados apresentados nesse trabalho sustentam essa idéia, contudo é importante salientar que a atividade das enzimas antioxidantes também manteve-se alta nos frutos condicionados a $37^\circ C$, mesmo que temporariamente.

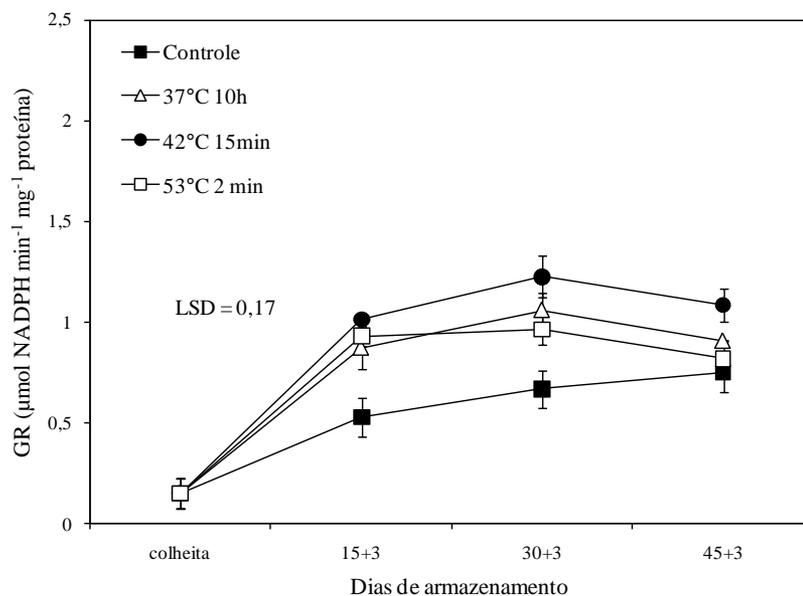


Figura 11 - Atividade específica da GR no flavedo da lima ácida ‘Tahiti’ na colheita e após 15, 30 e 45 dias a $1^\circ C$ seguida de 3 dias a $20^\circ C$. Barras verticais indicam o erro padrão ($n=4$). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD ($p<0,05$)

Assim, acredita-se que essa elevação na atividade das enzimas antioxidantes nos frutos condicionados a 37°C por 10 horas seja uma resposta do tecido à intensificação dos sintomas das injúrias de frio. Possivelmente, essa elevação não tenha sido suficientemente alta para evitar o estresse oxidativo visto que os níveis de superóxido e peróxido de hidrogênio mantiveram-se altos em todos os períodos avaliados. De maneira geral, a diferença na efetividade dos tratamentos avaliados em induzir tolerância ao frio indubitavelmente está ligada não somente ao estresse oxidativo, mas também a outros fatores como a presença do etileno no tecido. Provavelmente, a interação desses fatores com a baixa temperatura seja determinante na modulação da resposta requerida para promover maior ou menor tolerância ao frio.

2.2.4 Conclusões

Os tratamentos térmicos com água a 42°C por 15 minutos ou 53°C por 2 minutos conferem maior tolerância dos frutos ao frio devido à manutenção da estabilidade das membranas e redução da sensibilidade dos tecidos ao etileno.

2.3 Experimento 2

Redução das injúrias de frio em lima ácida ‘Tahiti’ por meio da aplicação de metil jasmonato, salicilato e 1-metilciclopropeno

2.3.1 Material e Métodos

Limas ácidas ‘Tahiti’, provenientes de um pomar comercial localizado no município de Mogi-Mirim, SP, foram colhidas com coloração verde-intensa e diâmetro médio de aproximadamente 6 centímetros. Após a colheita, os frutos foram transportados ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Pós-Colheita do Departamento de Ciências Biológicas, da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP, onde se procedeu à seleção, descartando-se frutos que apresentavam danos mecânicos e manchas na casca, em seguida foi realizada a homogeneização das amostras experimentais.

Os seguintes tratamentos foram aplicados:

Tratamento 1- Armazenamento a 1°C;

Tratamento 2- Imersão dos frutos em solução 1,0mM de metil jasmonato;

Tratamento 3- Imersão dos frutos em solução 1,0mM de metil salicilato;

Tratamento 4- Exposição dos frutos a 1000nL L⁻¹ de 1-metilciclopropeno.

Após a imersão dos frutos durante 3 minutos em água (controle) ou nas soluções de MeJA ou MeSA, os frutos foram acondicionados em caixas plásticas e expostos à temperatura ambiente para remover o excesso de água. Para a aplicação de 1-MCP utilizou-se o produto Smart Fresh[®], (0,14% de 1-MCP na formulação pó). O produto foi solubilizado em 15mL de água a 25°C em recipiente hermético e, posteriormente, a solução foi transferida para placa de petri, já no interior de uma caixa, a qual foi fechada imediatamente. Os frutos ficaram expostos ao tratamento por 12 horas a 25°C e, a seguir, juntamente com os que compunham os demais tratamentos, foram armazenados a 1°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) e 95% ($\pm 5\%$) de UR durante 45 dias.

As medidas da respiração, síntese de etileno e incidência de dano de frio foram realizadas a cada 5 dias, durante 45 dias de armazenamento. Aos 15, 30 e 45 dias, parte dos frutos foi removida da refrigeração e permaneceu durante 3 dias a 20°C, quando também foi medida a respiração, a síntese de etileno, o índice de injúrias de frio, a atividade *in vivo* da ACC oxidase e o

vazamento de íons ao final de cada período. Nesta ocasião foram retiradas amostras de flavedo de cada repetição para as demais avaliações realizadas, as quais seguem descritas:

- a) **Índice de injúrias de frio:** os frutos foram classificados em cinco categorias de acordo com a superfície da casca afetada (KLUGE et al., 2003): [0] sem depressões na casca; [1] 1 a 5%; [2] 5-25%; [3] 25-50%; [4] >50% da superfície afetada.
- b) **Respiração:** aproximadamente mil gramas de frutos de cada repetição foram transferidos para recipientes com volume de 1.700mL. Estes foram fechados hermeticamente durante 3 horas. Para a análise da produção de CO₂, foi injetada uma alíquota de 0,5mL de cada recipiente em um cromatógrafo a gás, marca Thermofinigan, modelo Trace GC Ultra, equipado com detector de ionização de chama (FID) e uma coluna de aço inox de 1/8" e 4,0m de comprimento, preparada com Porapak N 50/80. Como gás de arraste, utilizou-se o hidrogênio a um fluxo de 25mL min⁻¹. A temperatura da coluna, injetor e detector foram de 110, 140 e 200°C, respectivamente. Os resultados foram expressos em mL CO₂ kg⁻¹ h⁻¹, calculados em função da concentração de CO₂ presente no recipiente, da massa de frutos, do volume livre do recipiente e do tempo de fechamento do recipiente.
- c) **Síntese de etileno:** dos mesmos recipientes usados para a mensuração da respiração retirou-se uma alíquota de 0,5mL a qual foi injetada em um cromatógrafo a gás, marca Thermofinigan, modelo Trace GC Ultra, equipado com detector de ionização de chama (FID) e uma coluna de aço inox de 1/8" e 1,8m de comprimento, preparada com Porapak N 50/80. Como gás de arraste, utilizou-se o hidrogênio a um fluxo de 25mL min⁻¹. A temperatura da coluna, injetor e detector foram de 110, 140 e 200°C, respectivamente. Os resultados foram expressos em síntese de etileno (μL C₂H₄ kg⁻¹ h⁻¹), calculada com base na concentração de etileno no interior do recipiente, na massa de frutos, no volume livre do recipiente e no tempo de fechamento do recipiente.
- d) **Atividade *in vivo* da ACC oxidase (ACO):** determinada de acordo com Dupille e Zacarias (1996). Discos de flavedo dos frutos foram lavados com água deionizada duas vezes. Após secos com papel filtro, os discos (2,0g) foram incubados em solução contendo tampão fosfato de potássio 25mM (pH 6,0), manitol 0,8M e ACC 5mM. Os discos de flavedo permaneceram incubados por uma hora na referida solução e, a seguir, foram secos em papel filtro e imediatamente acondicionados em frascos herméticos de 40mL e

incubados a 30°C. Depois de uma hora, a concentração de etileno presente nos frascos foi determinada e os valores expressos em $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

- e) **Atividade *in vitro* da ACC oxidase (ACO, EC 1.14.17.4):** determinada de acordo com a metodologia proposta por Moya-Leòn e John (1994) com algumas modificações. Amostras de flavedo congelado foram pulverizadas em moinho com nitrogênio líquido. A seguir, aproximadamente um grama do tecido foi homogeneizado em tampão de extração contendo Tris-HCl 100mM pH 7,5 contendo 5mM DTT; glicerol 10% (w/v); 30mM ascorbato de sódio e PVPP 4% (p/v). A seguir, o homogeneizado foi filtrado com gaze e centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C. O ensaio foi realizado incubando-se 1,0mL do sobrenadante contendo a enzima com 2,0mL da solução de reação contendo tampão tricina 0,1M pH 7,5; 0,1mM FeSO_4 ; 1mM ACC; 20mM NaHCO_3 e 30mM ascorbato de sódio. Após incubação da solução a 30°C em frasco hermético por 30 minutos a concentração de etileno presente nos frascos foi determinada e os valores expressos em $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.
- f) **Conteúdo de ACC livre (ACC) e malonilado (MACC):** foi mensurado segundo o método proposto por Lizada e Yang (1979) e modificado por Fils-Lycaon et al. (2008). Amostras de flavedo congelado foram pulverizadas em moinho com nitrogênio líquido. A seguir, o tecido foi homogeneizado em etanol 70% e aquecido a 100°C por 30 minutos e em seguida filtrado com gaze. O extrato resultante foi evaporado e o resíduo resultante ressuspenso em água. O sobrenadante foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos para clarear o extrato e o ACC livre foi quimicamente transformado em etileno conforme descrito anteriormente (LIZADA; YANG, 1979). O conteúdo de MACC foi determinado em extrato hidrolisado com HCl a 100°C por uma hora e neutralizado com NaOH (HOFFMAN et al., 1982). O extrato hidrolisado foi usado para determinação do conteúdo de ACC, de acordo com Lizada e Yang (1979). A diferença entre o conteúdo de ACC antes e após a hidrólise representa o conteúdo de MACC no extrato (HOFFMAN et al., 1983). Os resultados foram expressos em $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ tecido}$.
- g) **Vazamento de íons:** foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Vieira Santos et al. (2001). Discos de flavedo dos frutos foram lavados com água deionizada duas vezes. Após serem secos com papel filtro, os discos (2,0g) foram acondicionados em frascos contendo 50mL de solução 0,4M de manitol. Os frascos foram mantidos sob

agitação moderada por 3 horas quando então, foi medida a condutividade elétrica da solução a 25°C ($L_{inicial}$). A solução contida nos frascos foi congelada por 18 horas e, após este período, foi descongelada e novamente procedeu-se à medida da condutividade elétrica a 25°C (L_{final}). Os valores obtidos foram calculados por meio da fórmula $VI = (L_{final} - L_{inicial}) / L_{final} \times 100$ e expressos em condutividade relativa.

- h) Peroxidação lipídica:** foi determinada pela medição da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito previamente (BUEGE; AUST, 1978; DHINDSA; MATOWE, 1981). Um grama de tecido foi triturado em nitrogênio líquido e posteriormente homogeneizado em 5mL de ácido tricloroacético (TCA) (0,1%) juntamente com 20% de PVPP. Após completa homogeneização, o material foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos. Do sobrenadante foi retirado uma alíquota de 1,0mL a qual se adicionou 4mL de TCA (20%) contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico (TBA). A mistura foi aquecida a 95°C por 30 minutos, e rapidamente resfriada em banho de gelo. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 10.000 x g por 10 minutos para clarear o extrato e imediatamente a absorbância das TBARS formadas foi determinada em espectrofotômetro a 535nm. As medidas foram corrigidas para turbidez inespecífica pela subtração da absorbância a 600nm. A concentração das TBARS foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 155mM cm^{-1} .
- i) Peróxido de hidrogênio (H_2O_2):** o conteúdo de peróxido de hidrogênio na casca foi determinado de acordo com o método proposto por Gay et al. (1999) e Hermes-Lima et al. (1995), com modificações. Um grama de flavedo foi triturado em nitrogênio líquido e, posteriormente, homogeneizado em 10mL de metanol a 0°C. Após a completa homogeneização as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos. A seguir retirou-se uma alíquota de 35 μ L do sobrenadante, à qual se adicionou 500 μ L de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 1mM e 200 μ L de H_2SO_4 250mM. A mistura permaneceu em reação por 5 minutos no escuro. Em seguida adicionou-se 100 μ L de xilenol laranja 1mM e a mistura foi mantida no escuro por 20 minutos quando então procedeu-se à leitura da absorbância das amostras a 560nm. As leituras foram comparadas com uma curva padrão com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio.
- j) Radicais superóxido (O_2^-):** o conteúdo de radicais superóxido foi medido espectrofotometricamente a 490nm pela oxidação da epinefrina a adrenocromo (MISRA;

FRIDOVICH, 1972; MINIBAYEVA; BECKETT, 2001). A reação consistiu da adição de 100 μ L de extrato vegetal a 3,0mL de água pH 7,0 e 1mM epinefrina. Após a incubação sob agitação moderada por 20 minutos no escuro a reação foi parada adicionando-se 50 μ L de HCl 0,05N. Imediatamente procedeu-se à leitura da absorbância a 490nm. O conteúdo de radicais superóxido na casca foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar de 4,47mM cm⁻¹.

- k) Extração protéica:** em cada período de avaliação, amostras da casca dos frutos de cada tratamento foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -30°C até o momento das análises. Aproximadamente um grama do flavedo congelado foi pulverizado em moinho com nitrogênio líquido. A seguir o tecido vegetal foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 100mM, pH 7,5, contendo 1mM de EDTA, 3mM de DTT e 4% (p/v) de PVPP. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e estocado em freezer a -30°C até o momento das análises.
- l) Atividade de superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1):** a atividade da SOD foi observada por meio de gel de poliacrilamida 12% não desnaturante (PAGE), conforme descrito em VITÓRIA et al. (2001). Cada gel permaneceu sob corrente elétrica de 20mA por aproximadamente 4 horas. Após a separação das proteínas, os géis foram enxaguados rapidamente em água destilada-deionizada e incubados durante 30 minutos no escuro à temperatura ambiente em uma solução contendo 50mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 1mM EDTA, 0,05mM riboflavina, 0,1mM NBT e 3% TEMED. Ao final de 30 minutos, a mistura de reação foi removida e os géis enxaguados com água destilada-deionizada e colocados sob iluminação por alguns minutos, para foto-oxidação das bandas. Para cada gel foram utilizados 7 μ L de SOD bovina (Sigma) como padrão.
- m) Atividade de catalase (CAT, EC 1.11.1.6):** determinada conforme Azevedo et al. (1998), pela decomposição do peróxido de hidrogênio a 240nm durante 1 minuto em uma reação contendo tampão fosfato de potássio 100mM pH7,5 e 2,5 μ L de peróxido de hidrogênio (30%). A reação foi iniciada pela adição de 15 μ L de extrato protéico.
- n) Atividade de ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11):** foi determinada por meio do método descrito em Nakano e Asada (1981). A mistura da reação consistiu de 650 μ L de tampão fosfato de potássio 80mM pH 7,0; 100 μ L ascorbato (5mM); 100 μ L EDTA (1mM); 100 μ L H₂O₂ (1mM) e 20 μ L de extrato. A atividade foi determinada pela degradação do

peróxido de hidrogênio durante 1 minuto, por alterações na absorvância a 290nm. A mistura de reação contendo tampão fosfato, ascorbato e EDTA permaneceu em banho-maria a 30°C. O peróxido de hidrogênio foi adicionado somente no início da leitura em espectrofotômetro.

- o) Atividade de glutathione redutase (GR, EC 1.6.4.2):** foi determinada espectrofotometricamente a 30°C, em uma mistura de reação, contendo tampão fosfato de potássio 100mM, pH 7,5, 1mM 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), 1mM glutathione oxidada (GSSG) e 0,1mM NADPH. A reação foi iniciada pela adição de 10µL de extrato. A GR foi estimada pela redução da glutathione oxidada, monitorada pela alteração da absorvância a 412nm (SMITH et al., 1988).
- p) Proteínas totais:** a concentração de proteínas foi determinada em espectrofotômetro a 595nm, de acordo com Bradford (1976), utilizando-se o BSA como padrão.

2.3.2 Delineamento experimental e análise dos dados

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições de 10 frutos. Para as análises bioquímicas foram usadas triplicatas de cada repetição. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e, havendo diferenças, as médias foram comparadas pelo teste LSD (*Least Significant Difference*) a 5% de probabilidade de erro.

Os procedimentos estatísticos foram executados com auxílio do pacote estatístico SOC (Software Científico: NTIA/EMBRAPA).

2.3.3 Resultados e Discussão

A exposição da lima ácida ‘Tahiti’ à temperatura de 1°C por período prolongado de tempo induziu o desenvolvimento de injúrias de frio no flavedo dos frutos. O aparecimento dos sintomas, caracterizados por lesões deprimidas, acompanhadas por descoloração do flavedo teve início a partir de 10 dias de exposição dos frutos à temperatura de 1°C e à medida que o período de armazenamento refrigerado foi estendido, acréscimos no índice de injúrias de frio foram observados, especialmente nos frutos controle (Figura 1A). À medida que os frutos foram removidos da refrigeração, aos 15, 30 e 45 dias e expostos a 20°C por 3 dias, verificou-se que os sintomas também foram intensificados e tornaram-se mais severos com o prolongamento do armazenamento (Figura 1B).

De modo geral, tanto o 1-MCP quanto o MeJA ou MeSA foram capazes de reduzir a sensibilidade da lima ácida ao frio, todavia a efetividade desses tratamentos na intensificação da tolerância dos frutos ao *chilling* foi diferenciada. Em relação ao controle, o tratamento dos frutos com 1-MCP reduziu a incidência de injúrias de frio ao final do armazenamento em 35%. Comparativamente, o tratamento dos frutos com MeJA ou MeSA demonstrou ser mais eficaz na redução dos sintomas, pois no mesmo período o flavedo dos frutos apresentou índice de injúrias de frio 66% inferior ao controle (Figura 1B).

Os resultados obtidos no presente trabalho estão em conformidade com outros estudos realizados anteriormente os quais já relataram a efetividade da aplicação de reguladores vegetais, como o ácido jasmônico e o ácido salicílico, na redução dos sintomas de *chilling* em vários tipos de frutos (WANG; BUTA, 1994; MEIR et al., 1996; DING et al., 2001; FENG et al., 2004; WANG et al., 2006). Adicionalmente, o bloqueio da ação do etileno, por meio do 1-MCP também tem propiciado considerável redução da incidência de injúrias de frio em frutos não-climatéricos, como o abacaxi (SELVARAJAH; BAUCHOT; JOHN, 2001) e a tangerina (SALVADOR, et al., 2006) e de frutos climatéricos como o melão, o abacate e o caqui (BEN-AMOR, et al., 1999; PESIS et al., 2002; SALVADOR et al., 2004). Por outro lado, em alguns casos o bloqueio ou a aplicação exógena do etileno também pode intensificar as injúrias de frio (PORAT et al., 1999; LAFUENTE et al., 2001). A observação de que o tratamento de frutos sensíveis ao frio com etileno induz a manifestação de sintomas de *chilling* tanto em climatéricos quanto em não-climatéricos pode ser interpretada como um forte indício de que esse hormônio desempenha um importante papel no desenvolvimento das injúrias de frio (CHAPLIN; WILLS; GRAHAM, 1983;

YUEN et al., 1995). Contudo, a participação do etileno nesse processo permanece ainda pouco compreendida.

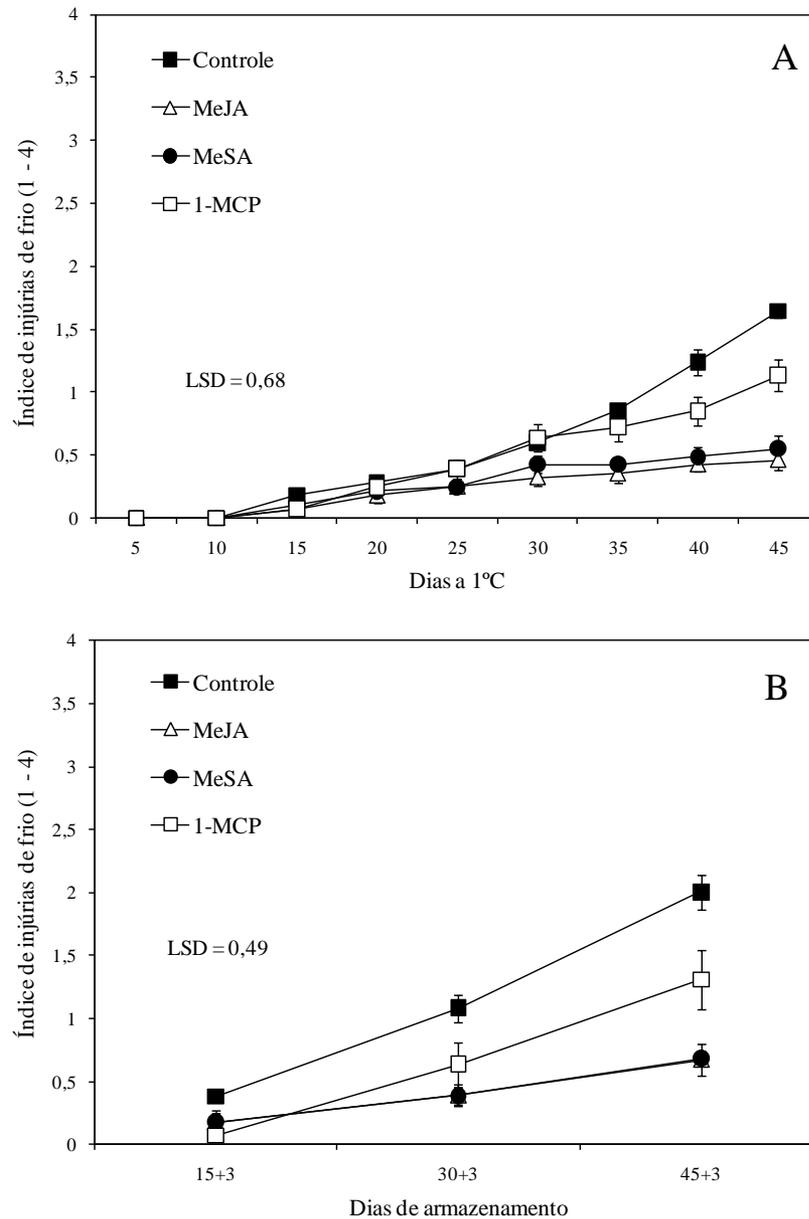


Figura 1 - Índice de injúrias de frio em lima ácida 'Tahiti' durante o armazenamento a 1°C (A) e após a remoção dos frutos da refrigeração aos 15, 30 e 45 dias seguida de 3 dias a 20°C (B). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Índice de injúrias de frio: 0 = sem depressões; 1 = 1 a 5%; 2 = 5-25%; e 3 = 25-50%; 4 = >50% da superfície afetada

O padrão respiratório dos frutos apresentou leve diminuição ao longo do período sob refrigeração, porém após 45 dias a 1°C, a atividade respiratória dos frutos foi intensificada, independente dos tratamentos aplicados (Figuras 2A e 3A). Com a exposição dos frutos a 20°C a atividade respiratória foi estimulada, contudo não foram verificadas diferenças entre os frutos tratados com 1-MCP, MeJA ou MeSA em relação ao controle. De acordo com Schirra (1992), em alguns casos, o acréscimo na atividade respiratória e na síntese de etileno pode preceder o aparecimento dos sintomas de *chilling* em frutos aparentemente sadios.

O reaquecimento dos frutos exerceu estímulo à atividade respiratória, sendo que, aos 45+3 dias a produção de CO₂ dos frutos controle foi significativamente superior a produção dos demais frutos no mesmo período e cerca de 10 vezes maior que a observada durante a refrigeração (Figuras 2A e 2B). Em plantas intactas ou ainda em órgãos isolados submetidos à condição de *chilling*, o maior estímulo ao consumo de oxigênio, quando o tecido é reaquecido, pode estar relacionado ao processo de desacoplamento da respiração (CREENCIA; BRAMLAGE, 1971; VERCESI et al., 2006) e a mudanças no transporte de elétrons através da oxidase alternativa (LEOPOLD; MUSGRAVE, 1979) de modo a evitar a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e o consequente estresse oxidativo ao tecido (MAXWELL; WANG; MACINTOSH, 1999).

A síntese de etileno permaneceu abaixo do limite de detecção durante os primeiros 15 dias a 1°C e a seguir exibiu um pequeno acréscimo em todos os tratamentos, coincidindo com o aparecimento das injúrias de frio no flavedo dos frutos (Figuras 3A). Com o avanço do armazenamento verificou-se que a síntese de etileno exibida pelos frutos controle e os tratados com 1-MCP aumentou linearmente, atingindo a produção máxima de 0,1 μL C₂H₄ kg⁻¹ h⁻¹ aos 45 dias. Por outro lado, a síntese permaneceu significativamente mais baixa nos frutos tratados com MeJA ou MeSA, variando entre 0,01 a 0,04 μL C₂H₄ kg⁻¹ h⁻¹ dos 20 aos 45 dias.

Apesar do conhecido efeito estimulatório dos jasmonatos sobre a síntese de etileno (SANIEWSKI; NOWACKI; CZAPSKI, 1987; FAN; MATTHEIS; FELLMAN, 1998), neste estudo não foi observado em nenhum momento, significativo incremento na síntese de etileno por parte dos frutos previamente tratados com MeJA. Por outro lado, o efeito inibitório do ácido salicílico sobre a síntese de etileno, embora ainda não observado em espécies cítricas, foi reportado anteriormente em bananas, maçãs, tomates e em cultivo de células de pêra em suspensão (SRIVASTAVA; DWIVEDI, 2000; ROMANI; HESS; LESLIE, 1989; DING; WANG,

2003; LESLIE; ROMANI, 1988). De acordo com Leslie e Romani (1988), o ácido salicílico inibe a conversão do ACC em etileno, catalisada pela enzima ACO.

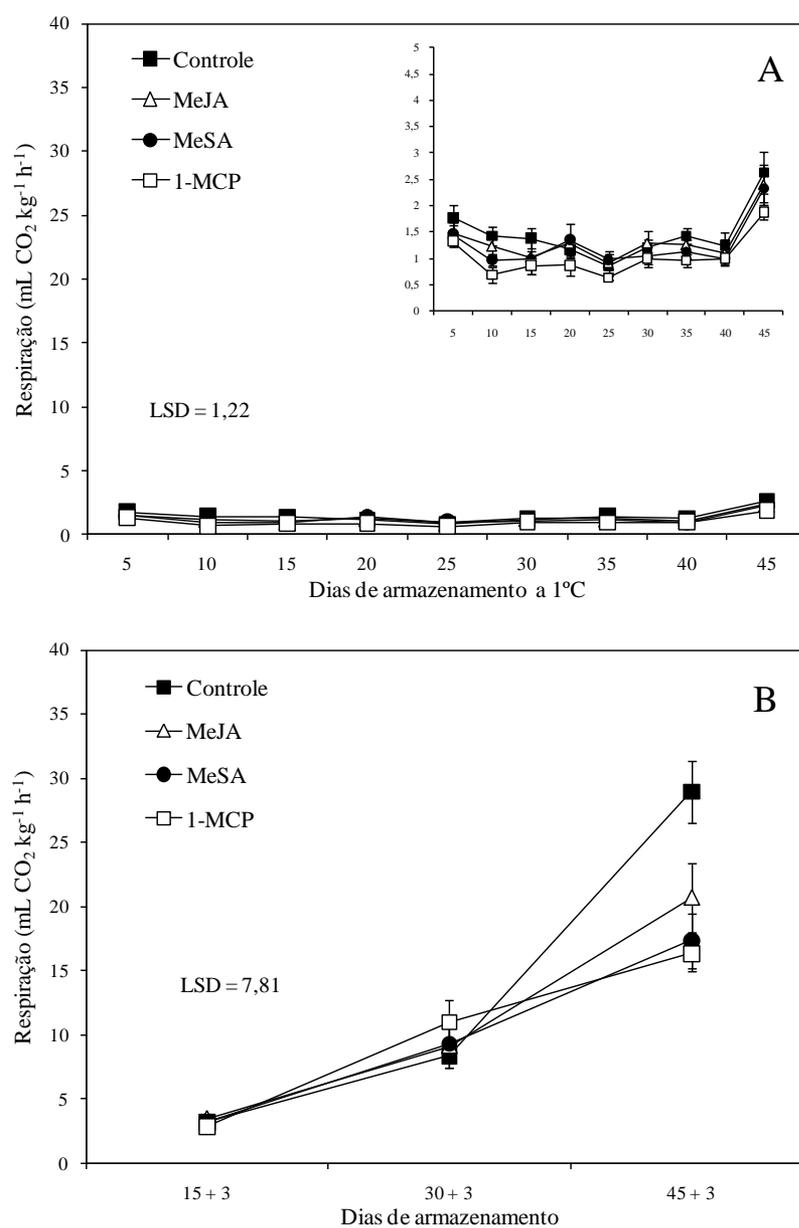


Figura 2 – Atividade respiratória da lima ácida ‘Tahiti’ durante o armazenamento a 1°C (A) e após a remoção dos frutos da refrigeração aos 15, 30 e 45 dias seguida de 3 dias a 20°C (B). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD (p<0,05)

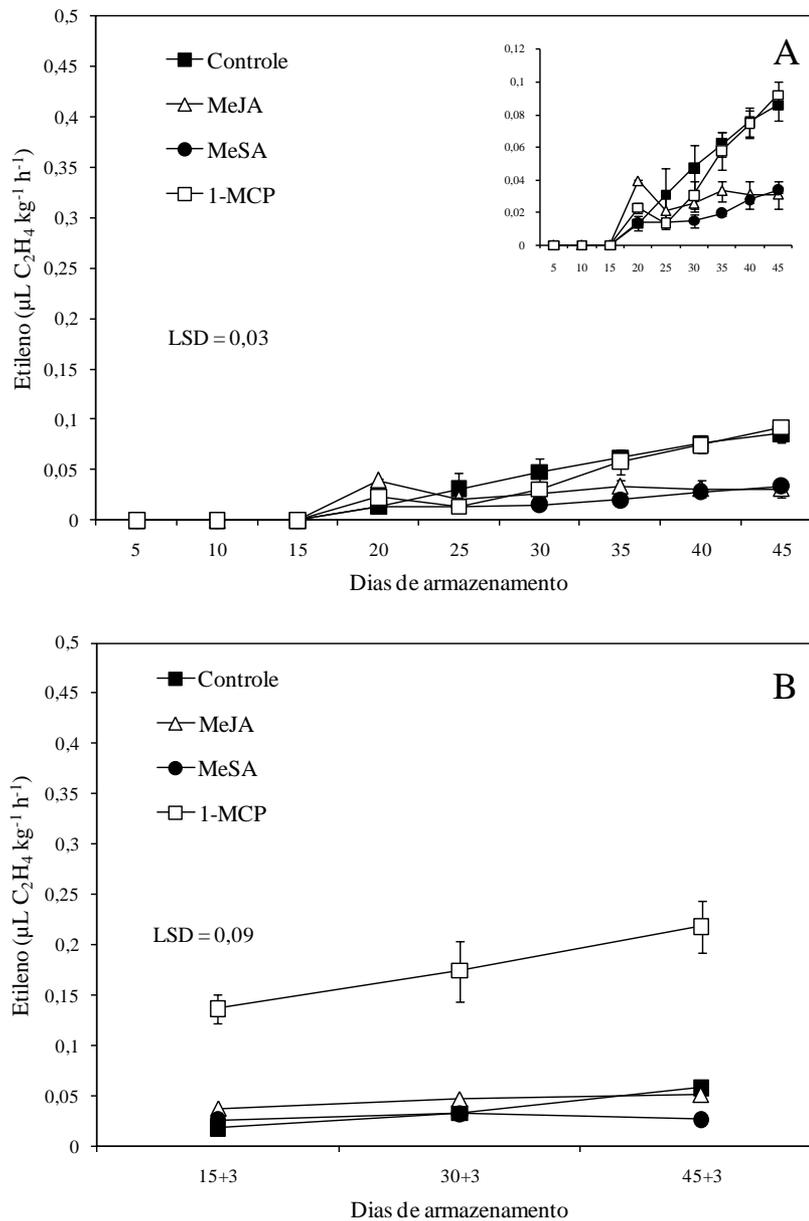


Figura 3 - Síntese de etileno durante o armazenamento da lima ácida ‘Tahiti’ a 1°C (A) e após a remoção dos frutos da refrigeração aos 15, 30 e 45 dias seguida de 3 dias a 20°C (B). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD ($p < 0,05$)

Com exceção dos frutos tratados com 1-MCP, nos demais, a síntese de etileno permaneceu baixa, mesmo após a exposição dos frutos (aos 15, 30 e 45 dias) à temperatura ambiente por 3 dias (Figura 3B). Nos frutos tratados com 1-MCP, todavia, a exposição a 20°C estimulou a produção de etileno. Em plântulas de feijoeiro, Sisler e Blankenship (1993) já haviam observado uma grande capacidade de produção de etileno quando os receptores de etileno haviam sido inativados. Além disso, em diferentes tipos de tecidos, como no caso do flavedo da lima ácida, o etileno exerce um efeito inibitório sobre sua própria síntese (RIOV; YANG, 1982). Dessa forma, a aplicação de 1-MCP nos frutos bloqueia esse mecanismo, induzindo a síntese de etileno (PORAT et al., 1999; LAFUENTE et al., 2001). Esse padrão, conhecido como auto-inibição da síntese de etileno, também foi observado anteriormente em outros frutos não-climatéricos durante situações de estresse por baixa temperatura (SELVARAJAH; BAUCHOT; JOHN, 2001; SALVADOR et al., 2005). Em confirmação a esse resultado verificou-se que, na presença de ACC exógeno, os discos de flavedo removidos dos frutos tratados com 1-MCP exibiram maior produção de etileno em todos os períodos avaliados, o que sustentaria, pelo menos em parte, a maior produção de etileno observada nos frutos intactos após a exposição à temperatura ambiente aos 15, 30 e 45 dias (Figura 4A).

Neste estudo, a atividade da ACO presente no flavedo dos frutos apresentou acréscimo ao longo do armazenamento em todos os frutos, tanto no ensaio *in vivo* quanto no *in vitro* (Figuras 4A e 4B). No entanto, essa intensificação na atividade não foi acompanhada por significativa evolução na síntese do etileno após o reaquecimento dos frutos, com exceção ao padrão observado nos frutos tratados com 1-MCP. Possivelmente esse resultado seja devido ao limitado conteúdo de ACC livre, disponível para ser oxidado a etileno, se comparado ao elevado conteúdo malonilado, fisiologicamente inativo (Figuras 2B, 5A e 5B). Acredita-se que o passo limitante ao característico *burst* de etileno estimulado pelo *chilling* em frutos envolva a inibição da síntese do precursor do etileno, o ACC. Vários estudos têm demonstrado que a síntese de ACC não ocorre durante o período em que os tecidos estão sob refrigeração, mas quando expostos à temperatura ambiente (FIELD, 1981; ANDERSEN; KENT, 1982; WANG; ADAMS, 1982; KENT; ANDERSEN; PIKE, 1988). Todavia, a resposta associada ao acúmulo de ACC nos tecidos pode ser variável, dependendo da espécie e da duração do *chilling* (CONCELLÓN; AÑÓN; CHAVES, 2005). Em pimentões maduros, de coloração verde, o conteúdo de ACC aumentou durante o

armazenamento a 2°C, enquanto nos de coloração vermelha nenhuma mudança no conteúdo do precursor imediato do etileno foi observada (SERRANO et al., 1997).

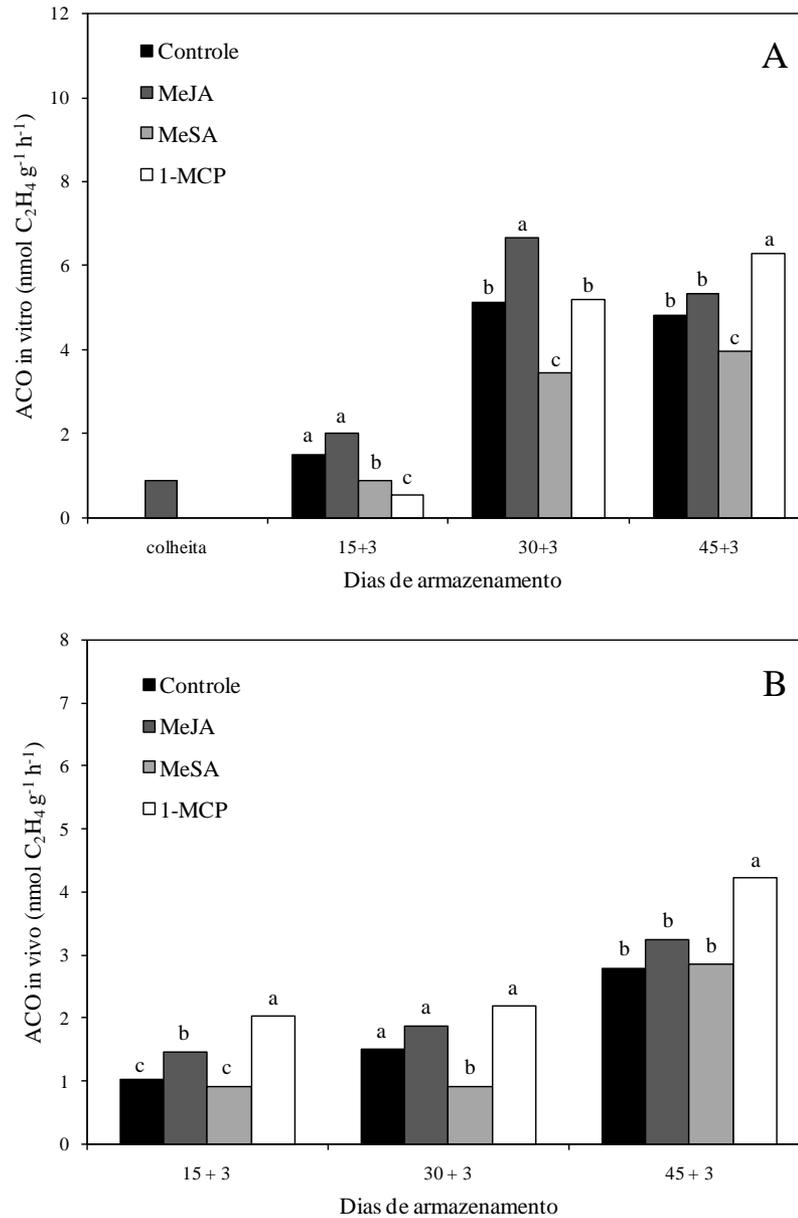


Figura 4 - Atividade *in vivo* (A) e *in vitro* (B) da ACO no flavedo da lima ácida ‘Tahiti’ após 15, 30 e 45 dias a 1°C seguida de 3 dias a 20°C. Tratamentos seguidos pela mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$)

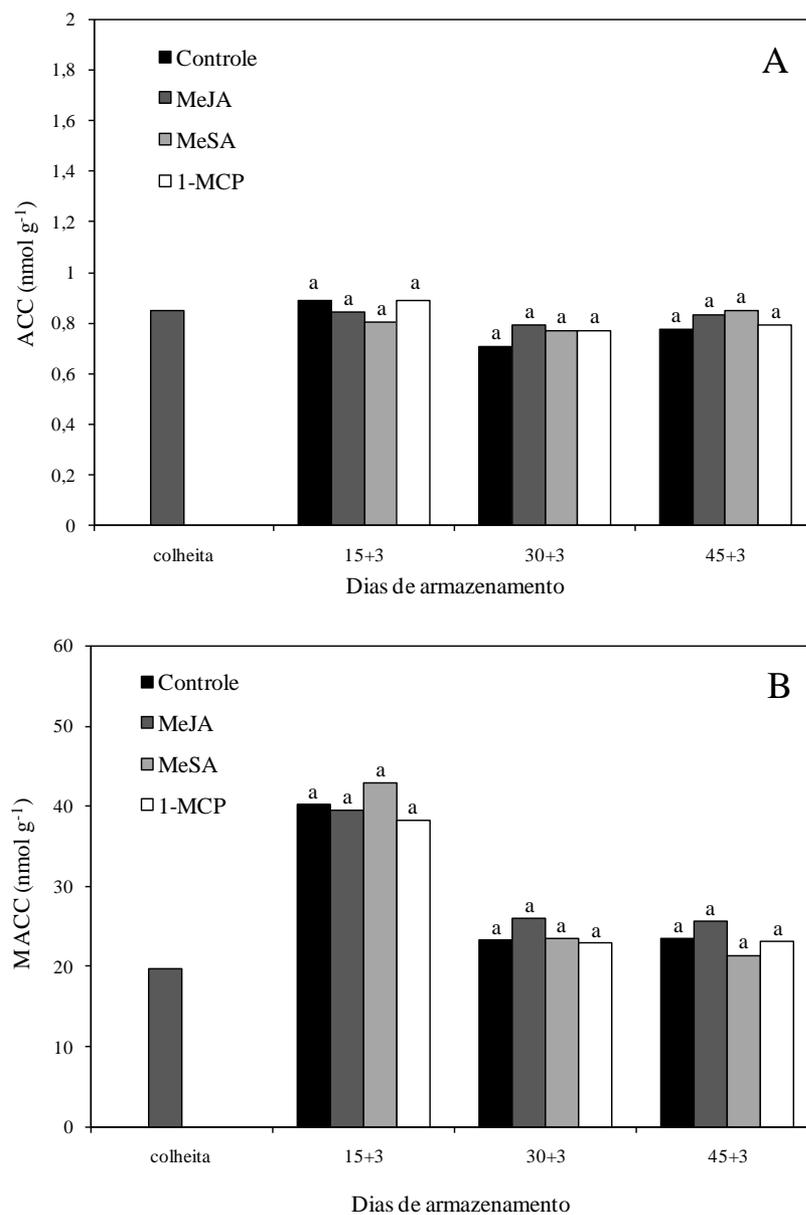


Figura 5 – Conteúdo de ACC livre (A) e malonilado (B) no flavedo da lima ácida ‘Tahiti’ na colheita e após 15, 30 e 45 dias a 1°C seguido de 3 dias a 20°C. Tratamentos seguidos pela mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$)

A alteração ou perda da seletividade das membranas, devido a mudanças na estrutura ou funcionalidade, pode ser considerada como um dos primeiros eventos em nível molecular que ocorre durante a exposição de frutos sensíveis à baixa temperatura (RAISON; ORR, 1990; MARANGONI; PALMA; STANLEY, 1996). Os resultados obtidos neste estudo, relativos à permeabilidade de membranas, demonstraram que o tratamento da lima ácida com MeJA, MeSA ou 1-MCP antes do armazenamento a 1°C possibilitou maior manutenção da integridade das membranas quando comparados ao controle durante os primeiros 30+3 dias de armazenamento, pois preveniu o aumento no vazamento de íons no flavedo dos frutos (Figura 6A). No entanto, ao final do experimento não foram observadas diferenças no percentual de vazamento de íons dos frutos tratados em relação ao controle.

O acúmulo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), indicativas de peroxidação de lipídios das membranas, apresentou, em todos os tratamentos, pequeno acréscimo em relação ao conteúdo observado no flavedo dos frutos na ocasião da colheita. Diferentemente do padrão verificado no vazamento de íons, não houve diferença entre o conteúdo de TBARS acumulado no flavedo dos frutos tratados e no controle em nenhuma das avaliações realizadas (Figura 6B).

Se considerarmos que mesmo no flavedo dos frutos controle o índice de dano de frio não atingiu a incidência máxima ao final do armazenamento, é possível que o processo de degradação das membranas do flavedo não tenha sido suficientemente elevado a ponto de promover significativas alterações à estrutura celular que comprometessem a sua funcionalidade. Alternativamente, a possível ausência de diferença entre o conteúdo acumulado de produtos da peroxidação lipídica no flavedo dos frutos também pode estar relacionada ao fato da distribuição das lesões sobre a superfície do fruto não ser uniforme, e os frutos que compunham as amostras experimentais não apresentavam a mesma incidência de dano.

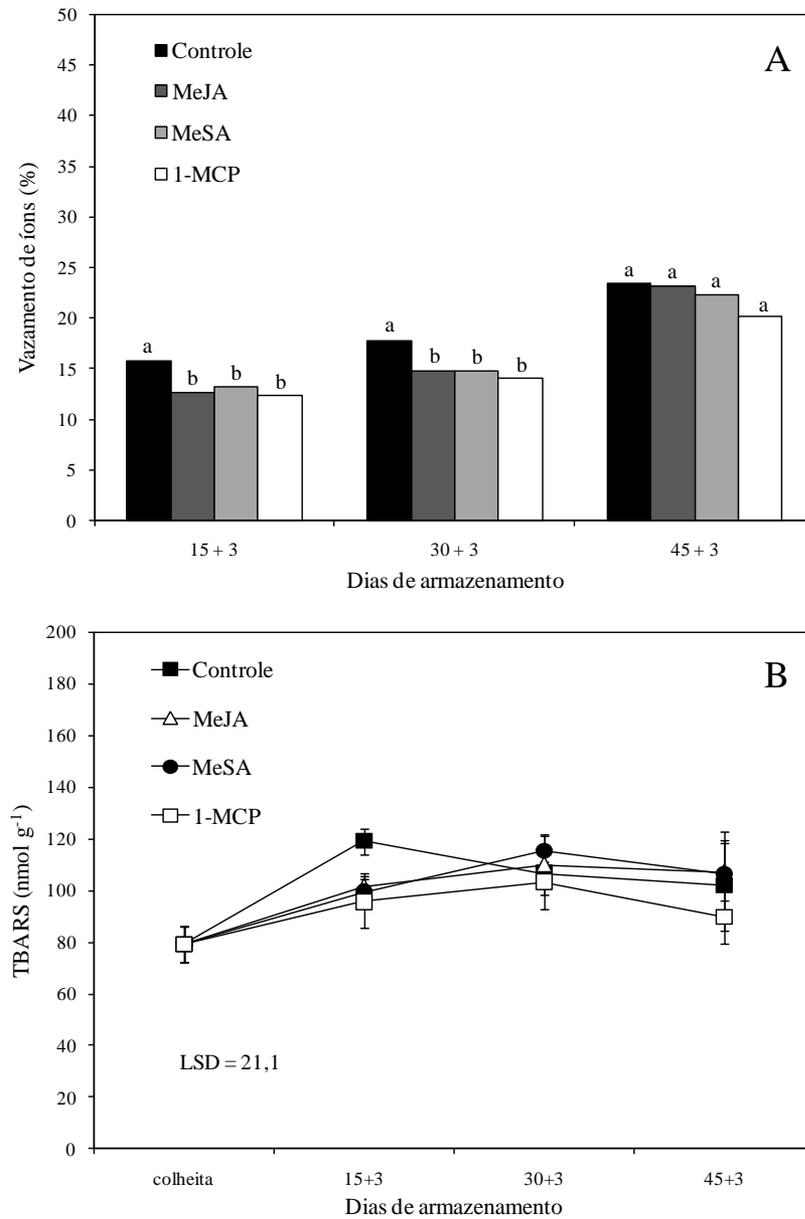


Figura 6 – Vazamento de íons (A) e conteúdo de TBARS (B) no flavedo da lima ácida ‘Tahiti’ após 15, 30 e 45 dias a 1°C seguido de 3 dias a 20°C. Em (A) tratamentos seguidos pela mesma letra, em cada período, não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$). Em (B) as barras verticais indicam o erro padrão ($n=4$). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD ($p < 0,05$)

Em frutos cítricos, assim como em outras espécies sensíveis ao frio, vários estudos têm sugerido que o *chilling* promove e intensifica o estresse oxidativo nos tecidos (SALA, 1998; HARIYADI; PARKIN, 1991; WANG, 1995; DAT et al., 2000) por perturbar o equilíbrio entre a geração e a remoção de radicais livres, como o superóxido e o peróxido de hidrogênio (ZHANG et al., 1995). Essas espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser potencialmente danosas ao metabolismo celular quando produzidas em excesso, pois agravam o estresse oxidativo promovendo a inativação de enzimas e a peroxidação de lipídios das membranas (WANG, 1995; HODGES et al., 2004). No flavedo da lima ácida, houve elevação na geração de radicais superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) após 15 dias de refrigeração mais 3 dias à temperatura ambiente (Figuras 7A e 7B). A partir dos 15+3 dias, o conteúdo de O_2^- acumulado no flavedo dos frutos controle e dos frutos tratados com 1-MCP manteve-se alto e com tendência de elevação ao final do armazenamento. Por outro lado, nos frutos tratados com MeJA ou MeSA o conteúdo de O_2^- no flavedo foi inferior ao verificado no controle aos 15 e 30 dias, porém apenas aos 45+3 dias essa diferença teve significância estatística (Figura 7A).

Embora tenham sido verificadas algumas diferenças em relação ao acúmulo de radicais superóxido no flavedo dos frutos, os níveis não foram drasticamente alterados a partir dos 15+3 dias, possivelmente em função da elevação da atividade total da superóxido dismutase (SOD) no mesmo período (Figura 8). A dismutação dos radicais superóxido, mediante a ação da SOD, resultou em maior acúmulo de H_2O_2 aos 15+3 dias, no flavedo dos frutos controle e dos tratados com 1-MCP ou MeSA. Em contraste, o tratamento da lima ácida com MeJA resultou em menor acúmulo de H_2O_2 no mesmo período. Em estudo realizado com nêspas, Cao et al. (2009) observaram que, além de conferir aos frutos maior tolerância ao frio, a aplicação de $10\mu\text{mol L}^{-1}$ de MeJA reduziu em aproximadamente 22% o acúmulo de O_2^- e de H_2O_2 nos tecidos, em relação ao controle.

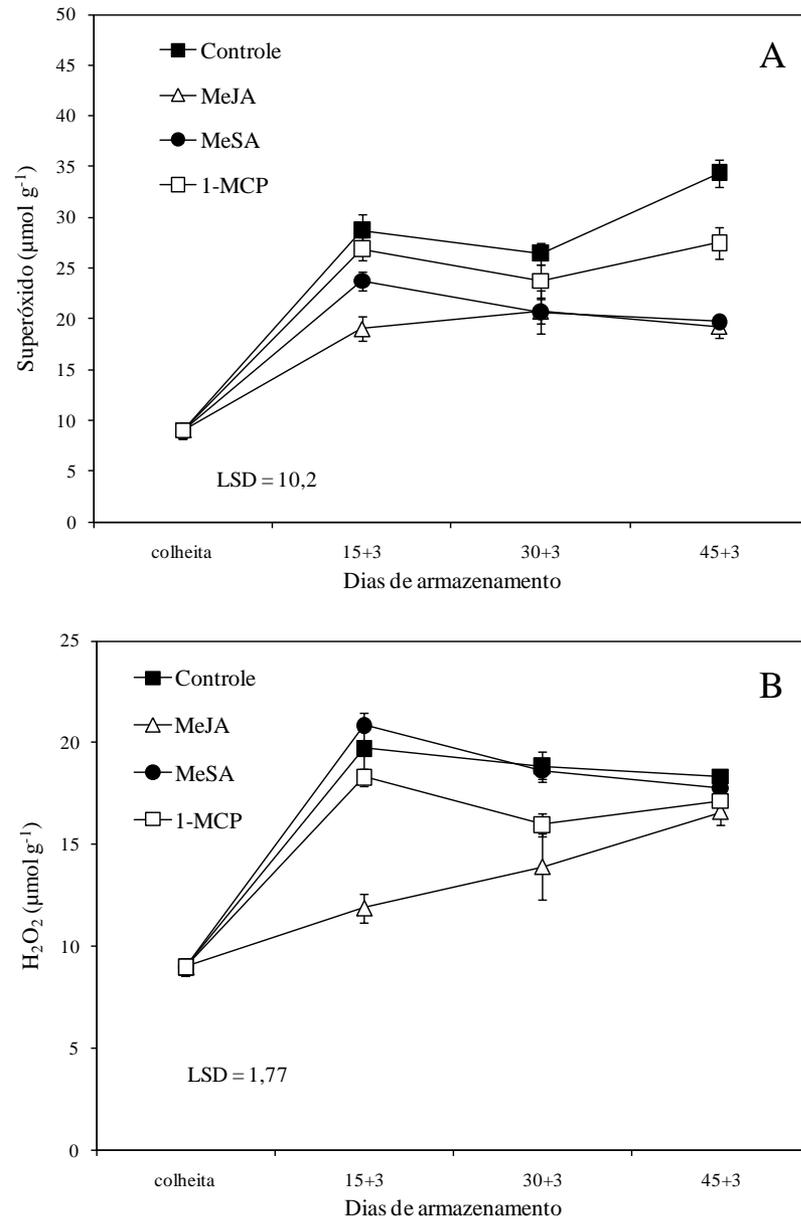


Figura 7 – Conteúdo de radicais superóxido (A) e peróxido de hidrogênio (B) no flavedo da lima ácida ‘Tahiti’ na colheita e após 15, 30 e 45 dias a 1°C seguido de 3 dias a 20°C. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD ($p < 0,05$)

A SOD representa a primeira linha de defesa celular contra os danos ocasionados pelas espécies reativas de oxigênio (ALSHER; ERTURK; HEATH, 2002; MITTLER, 2002). No flavedo da lima ácida, a atividade da SOD em PAGE não desnaturante revelou a existência de sete isoformas (Figura 8). Nos primeiros 15 dias de exposição dos frutos a 1°C seguidos de mais 3 dias a 20°C, mesmo não havendo significativa evolução dos sintomas de *chilling*, verificou-se que as isoformas I e IV foram mais ativas, em resposta à elevação na geração de radicais superóxido. Contudo, a intensidade das bandas foi similar entre frutos tratados e não tratados em relação a essas isoformas. Nos frutos controle as isoformas V, VI e VII foram inibidas durante os primeiros 30 dias, indicando que os demais tratamentos foram capazes de estimular um maior número de isoformas e, com isso, remover o superóxido gerado em reações localizadas em diferentes organelas (USHIMARU et al., 1995). Além disso, as isoformas I e IV atingiram a maior elevação na intensidade de bandas aos 30 dias, nos frutos tratados com MeJA ou MeSA, enquanto no flavedo do controle foi visualmente menor. Esse resultado pode explicar o menor conteúdo de O_2^- observado nos frutos aos 15 e 30 dias no flavedo dos frutos tratados com MeJA ou MeSA. No final do armazenamento, a intensidade de banda das isoformas da SOD, presentes no flavedo dos frutos tratados com MeSA, permaneceu praticamente semelhante àquela observada aos 30 dias, enquanto nos frutos tratados com MeJA ou 1-MCP houve redução significativa na intensidade das bandas representadas pelas isoformas V, VI e VII.

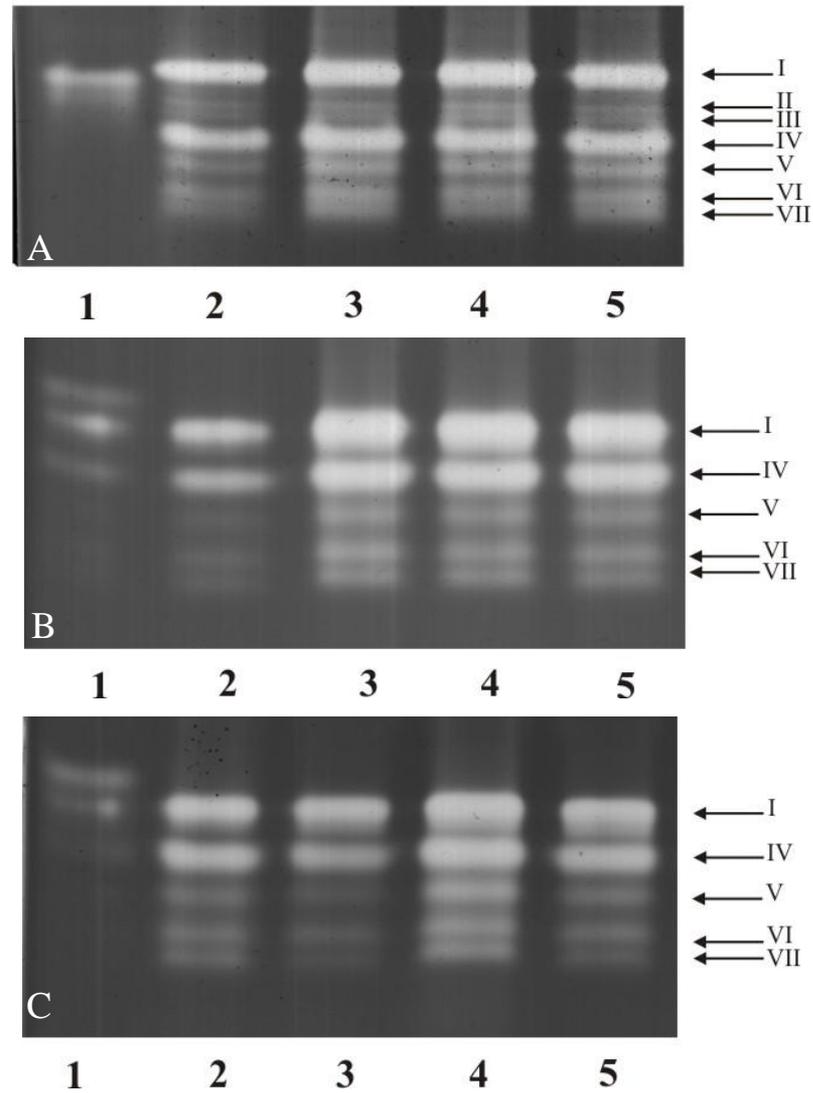


Figura 8 - Atividade da superóxido dismutase em gel de poliacrilamida não desnaturante aos 15 (A), 30 (B) e 45 (C) dias a 1°C (+3 dias a 20°C). (1) padrão de SOD bovina, (2) controle, (3) 1,0mM MeJA, (4) 1,0mM MeSA, (5) 1000nL L⁻¹ 1-MCP. As setas laterais representam as isoformas de SOD presentes no flavedo dos frutos

Um crescente número de estudos têm sugerido que o estresse oxidativo pode estar envolvido no desenvolvimento dos sintomas de *chilling* (HARIYADI; PARKIN, 1991; SALA, 1998; ZHENG et al., 2008; CAO et al., 2009) e que há uma positiva relação entre a elevação na atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX) e a aquisição de tolerância dos tecidos às injúrias de frio (WANG, 1995; SALA, 1998). Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com essas afirmações, pois a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo do peróxido de hidrogênio não foi significativamente alterada ao longo do armazenamento no flavedo dos frutos controle, local onde a incidência de injúrias de frio foi maior. Além disso, durante o armazenamento houve considerável intensificação da atividade da SOD, CAT, APX e GR no flavedo dos frutos tratados com 1,0mM de MeJA ou MeSA e essa maior capacidade de remoção das espécies reativas de oxigênio foi acompanhada de significativa redução das injúrias de frio nos respectivos frutos (Figuras 8, 9, 10 e 11). Esses resultados indicam que, assim como observado em outros frutos, o estresse oxidativo também pode estar envolvido no desenvolvimento das injúrias de frio no flavedo da lima ácida ‘Tahiti’ (SALA, 1998; ZHENG et al., 2008; CAO et al., 2009).

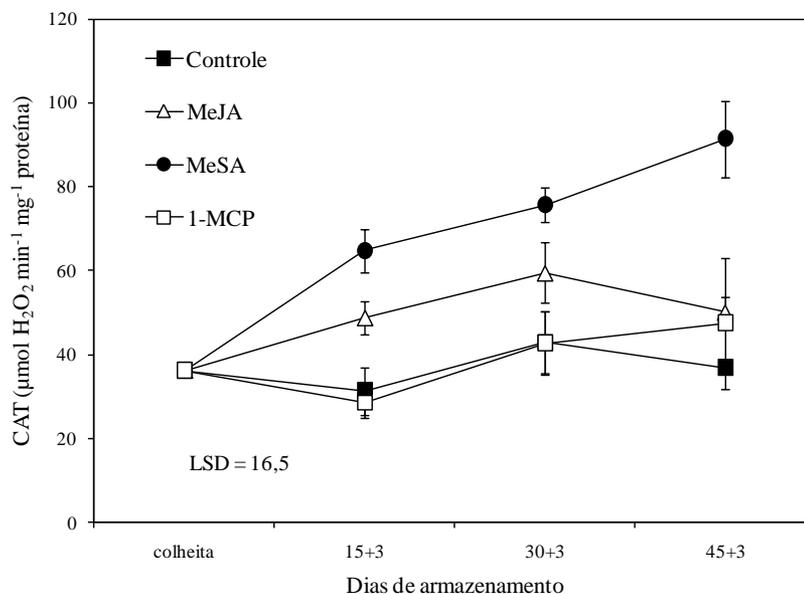


Figura 9 – Atividade específica da CAT no flavedo da lima ácida ‘Tahiti’ na colheita e após 15, 30 e 45 dias a 1°C seguida de 3 dias a 20°C. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD (p<0,05)

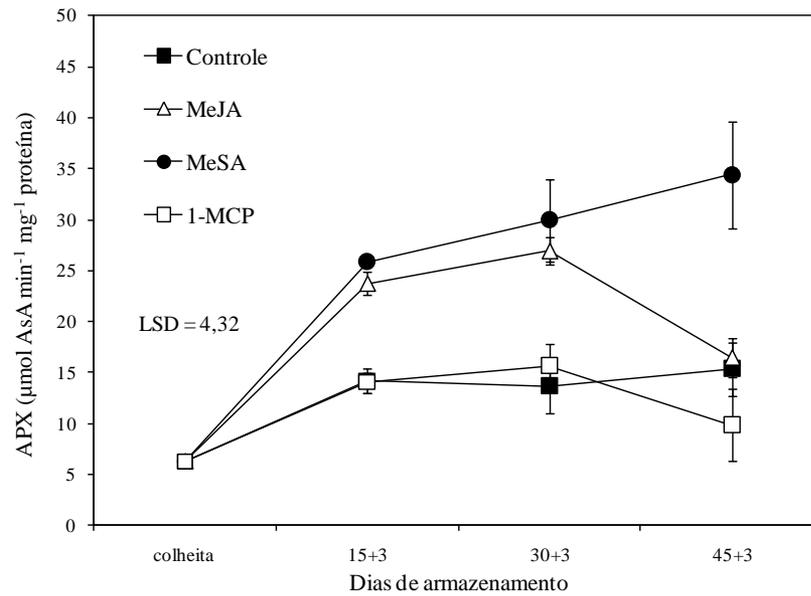


Figura 10 - Atividade específica da APX no flavedo da lima ácida ‘Tahiti’ na colheita e após 15, 30 e 45 dias a 1°C seguida de 3 dias a 20°C. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD ($p < 0,05$)

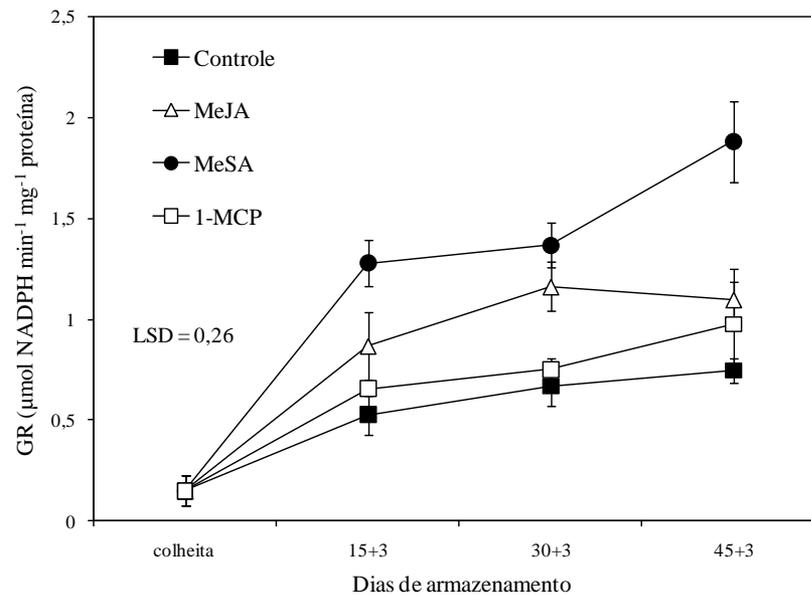


Figura 11 - Atividade específica da GR no flavedo da lima ácida ‘Tahiti’ na colheita e após 15, 30 e 45 dias a 1°C seguida de 3 dias a 20°C. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD ($p < 0,05$)

Apesar do tratamento dos frutos com 1-MCP também ter propiciado redução das injúrias de frio na lima ácida, sua efetividade não foi associada à atividade da CAT, APX e GR, pois no flavedo dos frutos a atividade destas enzimas antioxidantes foi pouco alterada a partir dos 15+3 dias e foi sempre semelhante ao controle. A razão para a reduzida atividade das enzimas antioxidantes no flavedo dos frutos tratados com 1-MCP não é clara, considerando que a supressão da produção autocatalítica de etileno em melões cantalupe aumentou consideravelmente a atividade da superóxido dismutase, catalase e peroxidase, particularmente após a remoção dos frutos da refrigeração (BEN-AMOR et al., 1999). Uma possível explicação para esse resultado talvez esteja diretamente relacionada à presença de uma maior concentração de etileno no tecido da lima ácida, devido ao processo de auto-inibição do etileno descrito anteriormente (Figuras 3A e 3B). Em melões cantalupe, a associação do etileno no tecido com a baixa temperatura reduziu a atividade das enzimas antioxidantes e foi responsável pelo estímulo dos eventos de degradação (BEN-AMOR et al., 1999). Dessa forma, é possível que a presença desse etileno “residual” presente no flavedo da lima ácida possa ter sido responsável pela menor atividade das enzimas responsáveis pela remoção do peróxido de hidrogênio, reduzindo assim a efetividade do bloqueio do etileno na redução das injúrias de frio.

2.3.4 Conclusões

A aplicação de metil jasmonato ou salicilato na concentração de 1,0mM promove maior tolerância da lima ácida à baixa temperatura.

A redução das injúrias de frio no flavedo dos frutos tratados com metil salicilato está relacionada à elevação e manutenção da atividade de enzimas antioxidantes.

2.4 Experimento 3

Tratamento térmico com água retarda o desenvolvimento dos sintomas de dano de frio em bananas ‘Nanicão’

2.4.1 Material e Métodos

Bananas ‘Nanicão’, provenientes de um pomar comercial localizado no município de Tietê, SP, foram colhidas em estágio de maturação fisiológica. Após a colheita dos cachos e despenca, os frutos foram transportados até o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Pós-Colheita do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ, em Piracicaba, SP.

Inicialmente, procedeu-se à remoção dos frutos das pencas, descartando-se àqueles com danos mecânicos e manchas na casca. Com objetivo de evitar o desenvolvimento de podridões que poderiam influenciar a síntese de etileno e comprometer a avaliação visual dos sintomas das injúrias de frio, os frutos foram imersos em solução fungicida de Sportak[®] (Prochloraz 300 μ L L⁻¹) durante 5 minutos. No dia seguinte procedeu-se uma nova seleção dos frutos e, a seguir, foi realizada a homogeneização das amostras experimentais e aplicação dos tratamentos.

Os tratamentos térmicos consistiram da imersão pós-colheita de frutos em água quente, com auxílio de um banho-térmico marca Tecnal, e da exposição de frutos ao ar quente acondicionando-os em câmaras do tipo B.O.D., conforme descrito a seguir:

Tratamento 1- Armazenamento a 6°C;

Tratamento 2- Exposição dos frutos a 37°C por 10 horas e armazenamento a 6°C;

Tratamento 3- Imersão dos frutos em água a 42°C por 15 minutos e armazenamento a 6°C;

Tratamento 4- Imersão dos frutos em água a 53°C por 2 minutos e armazenamento a 6°C.

Após a aplicação dos tratamentos térmicos, os frutos foram acondicionados em caixas plásticas e expostos à temperatura ambiente para secagem por alguns minutos. A seguir, as bananas foram submetidas à temperatura de 6°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) e 90% ($\pm 5\%$) de UR durante 15 dias. Ao final de cada período de armazenamento (5, 10 e 15 dias) parte dos frutos foi removida da refrigeração e exposta à temperatura de 20°C durante 3 dias. A incidência de injúrias de frio, a taxa respiratória e síntese de etileno foram determinadas durante o armazenamento refrigerado e ao final de cada período a 20°C. Em contrapartida, procedeu-se a retirada de amostras da casca

dos frutos para a determinação da atividade *in vivo* da ACC oxidase e vazamento de íons ao final de cada período a 20°C. As avaliações realizadas estão descritas a seguir:

- a) **Índice de injúrias de frio:** a incidência foi determinada pelo grau de escurecimento da casca das bananas, de acordo com a escala proposta por Kondo et al. (2005), onde: [0] sem dano; [1] <25%; [2] 25-50% e [3] >50% da superfície da casca afetada.
- b) **Respiração:** aproximadamente quinhentos gramas de frutos de cada repetição foram transferidos para recipientes com volume de 1.700mL. Estes foram fechados hermeticamente durante 2 horas. Para a análise da produção de CO₂, foi injetada uma alíquota de 0,5mL de cada recipiente, em cromatógrafo a gás, marca Thermofinigan, modelo Trace GC Ultra, equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna de aço inox de 1/8” e 4,0m de comprimento, preparada com Porapak N 50/80. Como gás de arraste, utilizou-se o hidrogênio a um fluxo de 25mL min⁻¹. A temperatura da coluna, injetor e detector foram de 110, 140 e 200°C, respectivamente. Os resultados foram expressos em mL CO₂ kg⁻¹ h⁻¹, calculados em função da concentração de CO₂ presente no recipiente, da massa de frutos, do volume livre do recipiente e do tempo de fechamento do recipiente.
- c) **Síntese de etileno:** dos mesmos recipientes usados para a mensuração da respiração retirou-se uma alíquota de 0,5mL de cada recipiente a qual foi injetada em cromatógrafo a gás, marca Thermofinigan, modelo Trace GC Ultra, equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna de aço inox de 1/8” e 1,8m de comprimento, preparada com Porapak N 50/80. Como gás de arraste, utilizou-se o hidrogênio a um fluxo de 25mL min⁻¹. A temperatura da coluna, injetor e detector foram de 110, 140 e 200°C, respectivamente. Os resultados foram expressos em síntese de etileno (μL C₂H₄ kg⁻¹ h⁻¹), calculada com base na concentração de etileno no interior do recipiente, na massa de frutos, no volume livre do recipiente e no tempo de fechamento do recipiente.
- d) **Atividade *in vivo* da ACC oxidase (ACO):** determinada de acordo com a metodologia proposta por Liu et al. (1999). Discos de casca dos frutos foram lavados com água deionizada duas vezes. Após serem secos com papel filtro, os discos (1,0g) foram incubados em solução contendo tampão tricina 0,1M (pH 7,5), manitol 0,4M e ACC 1mM. Os discos de casca permaneceram incubados por uma hora na referida solução e, a seguir,

foram secos em papel filtro e imediatamente acondicionados em frascos herméticos de 40mL e incubados a 30°C. Decorrida uma hora, a concentração de etileno presente nos frascos foi determinada e os valores expressos em $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

- e) **Atividade *in vitro* da ACC oxidase (ACO, EC 1.14.17.4):** determinada de acordo com a metodologia proposta por Moya-Leòn e John (1994) com modificações. Amostras de casca congelada foram pulverizadas em moinho com nitrogênio líquido. A seguir, aproximadamente um grama do tecido foi homogeneizado em tampão de extração contendo Tris-HCl 100mM pH 7,5; 5mM DTT; glicerol 10% (w/v); 30mM ascorbato de sódio e PVPP 4% (p/v). A seguir, o homogeneizado foi filtrado com gaze e centrifugado a $10.000 \times g$ por 30 minutos a 4°C. O ensaio foi realizado incubando-se 1,0mL do sobrenadante contendo a enzima com 2,0mL da solução de reação contendo tampão tricina 0,1M pH 7,5; 0,1mM FeSO_4 ; 1mM ACC; 20mM NaHCO_3 e 30mM ascorbato de sódio. Após incubação da solução a 30°C em frasco hermético por 30 minutos a concentração de etileno presente nos frascos foi determinada e os valores expressos em $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.
- f) **Conteúdo de ACC livre (ACC) e malonilado (MACC):** foi mensurado segundo o método proposto por Lizada e Yang (1979) e modificado por Fils-Lycaon et al. (2008). Amostras de casca congelada foram pulverizadas em moinho com nitrogênio líquido. A seguir, o tecido foi homogeneizado em etanol 70% e aquecido a 100°C por 30 minutos e em seguida filtrado com gaze. O extrato resultante foi evaporado e o resíduo resultante ressuspendido em água. O sobrenadante foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 10 minutos para clarear o extrato e o ACC livre foi quimicamente transformado em etileno conforme descrito anteriormente (LIZADA; YANG, 1979). O conteúdo de MACC foi determinado em extrato hidrolisado com HCl a 100°C por uma hora e neutralizado com NaOH (HOFFMAN et al., 1982). O extrato hidrolisado foi usado para determinação do conteúdo de ACC, de acordo com Lizada e Yang (1979). A diferença entre o conteúdo de ACC antes e após a hidrólise representa o conteúdo de MACC no extrato (HOFFMAN et al., 1983). Os resultados foram expressos em $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ tecido}$.
- g) **Vazamento de íons:** foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Vieira Santos et al. (2001). Discos de casca dos frutos foram lavados com água deionizada duas vezes. Após serem secos com papel filtro, os discos (2,0g) foram acondicionados em frascos com 50mL de solução 0,4M de manitol. Os frascos foram mantidos, sob agitação

moderada por 3 horas quando então, foi medida a condutividade elétrica da solução a 25°C ($L_{inicial}$). A solução contida nos frascos foi congelada por 18 horas e após este período foi descongelada e novamente procedeu-se à medida da condutividade elétrica a 25°C (L_{final}). Os valores obtidos foram calculados por meio da fórmula $VI = (L_{final} - L_{inicial}) / L_{final} \times 100$ e expressos em condutividade relativa.

- h) Peroxidação lipídica:** foi determinada pela medição da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito previamente (BUEGE; AUST, 1978; DHINDSA; MATOWE, 1981). Um grama de tecido foi triturado em nitrogênio líquido e, posteriormente, homogeneizado em 5mL de ácido tricloroacético (TCA) (0,1%) juntamente com 20% de PVPP. Após completa homogeneização, o material foi centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos. Do sobrenadante foi retirado uma alíquota de 1,5mL a qual se adicionou 4mL de TCA (20%) contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico (TBA). A mistura foi aquecida a 95°C por 30 minutos e rapidamente resfriada em banho de gelo. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 10.000 x g por 5 minutos para clarear o extrato e imediatamente a absorbância das TBARS formadas foi determinada em espectrofotômetro a 535nm. As medidas foram corrigidas para turbidez inespecífica pela subtração da absorbância a 600nm. A concentração das TBARS foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 155mM cm^{-1} .
- i) Peróxido de hidrogênio (H_2O_2):** o conteúdo de peróxido de hidrogênio na casca foi determinado de acordo com o método proposto por Gay et al. (1999) e Hermes-Lima et al. (1995), com modificações. Um grama de tecido foi triturado em nitrogênio líquido e posteriormente homogeneizado em 10mL de metanol a 0°C. Após a completa homogeneização as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos. A seguir, retirou-se uma alíquota de 30 μ L do sobrenadante, à qual se adicionou 500 μ L de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 1mM e 200 μ L de H_2SO_4 250mM. A mistura permaneceu em reação por 5 minutos no escuro. Em seguida adicionou-se 100 μ L de xilenol laranja 1mM e a mistura foi mantida no escuro por 20 minutos quando então procedeu-se à leitura da absorbância das amostras a 560nm. As leituras foram comparadas com uma curva padrão com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio.
- j) Radicais superóxido (O_2^-):** o conteúdo de radicais superóxido foi medido espectrofotometricamente a 490nm pela oxidação da epinefrina a adrenocromo (MISRA;

FRIDOVICH, 1972; MINIBAYEVA; BECKETT, 2001). A reação consistiu da adição de 50µL de extrato vegetal a 3,0mL de água pH 7,0 e 1mM epinefrina. Após a incubação sob agitação moderada por 20 minutos no escuro a reação foi parada adicionando-se 50µL de HCl 0,05N, procedendo-se à leitura da absorbância a 490nm. O conteúdo de radicais superóxido na casca foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar de 4,47mM cm⁻¹.

- k) Extração protéica:** em cada período de avaliação (5+3, 10+3 e 15+3), amostras da casca dos frutos de cada tratamento foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -30°C até o momento das análises. Aproximadamente um grama da casca congelada foi pulverizada em moinho com nitrogênio líquido. A seguir o tecido vegetal foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 100mM, pH 7,5, contendo 1mM de EDTA, 3mM de DTT e 4% (p/v) de PVPP. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e estocado em freezer a -30°C até o momento das análises.
- l) Atividade de superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1):** a atividade da SOD foi observada por meio de gel de poliacrilamida 12% não desnaturante (PAGE), conforme descrito em VITÓRIA et al. (2001). Cada gel permaneceu sob corrente elétrica de 20mA por aproximadamente 4h. Após a separação das proteínas, os géis foram enxaguados rapidamente em água destilada-deionizada e incubados durante 30 minutos no escuro à temperatura ambiente em uma solução contendo 50mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 1mM EDTA, 0,05mM riboflavina, 0,1mM NBT e 3% TEMED. Ao final de 30 minutos, a mistura de reação foi removida, os géis enxaguados com água destilada-deionizada e colocados sob iluminação por alguns minutos para foto-oxidação das bandas. Para cada gel foram utilizados 7µL de SOD bovina (Sigma) como padrão.
- m) Atividade de catalase (CAT, EC 1.11.1.6):** determinada de acordo com Azevedo et al. (1998), pela decomposição do peróxido de hidrogênio a 240nm durante 1 minuto em uma reação contendo tampão fosfato de potássio 100mM pH7,5 e 2,5µL de peróxido de hidrogênio (30%). A reação foi iniciada pela adição de 50µL de extrato protéico.
- n) Atividade de ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11):** determinada através do método descrito em Nakano e Asada (1981). A mistura da reação consistiu de 650µL de tampão fosfato de potássio 80mM pH 7,0; 100µL ascorbato (5mM); 100µL EDTA (1mM);

100 μ L H₂O₂ (1mM) e 30 μ L de extrato. A atividade foi determinada pela degradação do peróxido de hidrogênio durante 1 minuto, por alterações na absorbância a 290nm. A mistura de reação contendo tampão fosfato, ascorbato e EDTA permaneceu em banho-maria a 30°C. O peróxido de hidrogênio foi adicionado somente no início da leitura em espectrofotômetro.

- o) Atividade de glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2):** foi determinada espectrofotometricamente a 30°C, em uma mistura de reação, contendo tampão fosfato de potássio 100mM, pH 7,5, 1mM 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), 1mM glutathione oxidada (GSSG) e 0,1mM NADPH. A reação foi iniciada pela adição de 50 μ L de extrato. A GR foi estimada pela redução da glutathione oxidada, monitorada pela alteração da absorbância a 412nm (SMITH et al., 1988).
- p) Proteínas totais:** a concentração de proteínas foi determinada em espectrofotômetro a 595nm de acordo com Bradford (1976), utilizando-se o BSA como padrão.

2.4.2 Delineamento experimental e análise dos dados

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições de 10 frutos. Para as análises bioquímicas foram usadas triplicatas de cada repetição. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e, havendo diferenças, as médias foram comparadas pelo teste LSD (*Least Significant Difference*) a 5% de probabilidade de erro.

Os procedimentos estatísticos foram executados com auxílio do pacote estatístico SOC (Software Científico:NTIA/EMBRAPA).

2.4.3 Resultados e Discussão

Sintomas característicos de injúrias de frio, tais como, pontuações necróticas e descoloração da casca foram evidenciados em bananas ‘Nanicão’ submetidas à temperatura de 6°C por 5 dias. O condicionamento dos frutos durante 10 horas a 37°C antes do armazenamento refrigerado não aumentou a tolerância dos frutos ao frio, pois o índice obtido aos 5 dias foi semelhante ao dos frutos controle (Figura 1). Com a exposição desses frutos à temperatura ambiente, por 3 dias, houve intensificação dos sintomas tornando-os mais evidentes. Contrariamente, os tratamentos térmicos por imersão reduziram a sensibilidade dos frutos ao frio, resultando em menor índice de injúrias na casca, mesmo após o reaquecimento dos frutos a 20°C. A imersão de bananas por 2 minutos em água a 53°C manteve os frutos com menor índice de escurecimento da casca por até 15 dias a 6°C quando comparado aos demais tratamentos empregados. Porém, após exposição à temperatura ambiente, aos 15 dias, esses frutos exibiram índice semelhante ao dos frutos submetidos a 42°C por 15 minutos, o qual ainda era levemente inferior ao índice máximo exibido pelo controle e pelos frutos condicionados a 37°C.

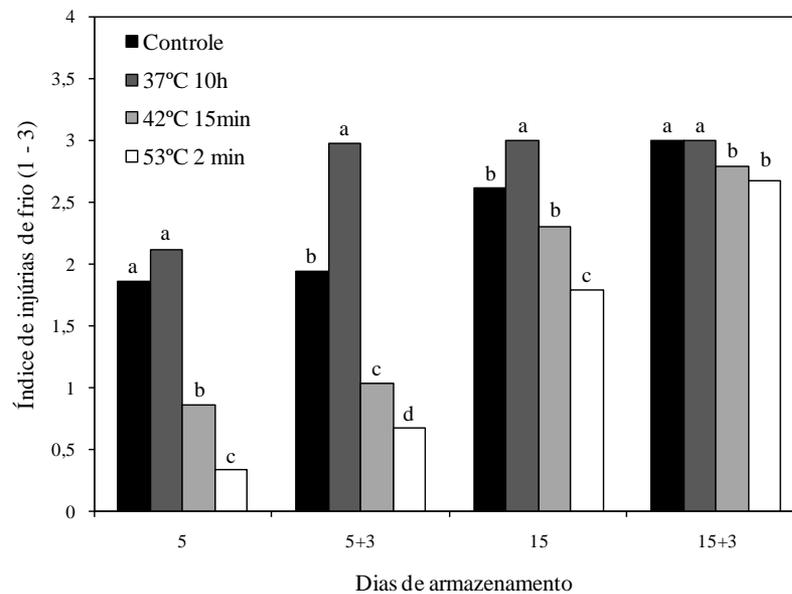


Figura 1 - Índice de injúrias de frio em banana ‘Nanicão’ aos 5 e 15 dias a 6°C e após a exposição dos frutos a 20°C por de 3 dias. Tratamentos seguidos pela mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$). Índice em função da superfície da casca afetada: 0 = sem dano; 1 = <25%; 2 = 25-50%; e 3 = >50%

A aplicação de tratamentos térmicos tem demonstrado ser eficaz na redução da intensificação dos sintomas de *chilling* em tomates (LURIE; SABEHAT, 1997), mangas (McCOLLUM et al., 1993) e abacates (WOOLF et al., 1995). Em bananas ‘Namwa’ e ‘Gros Michel’ a imersão em água a 42°C por 15 minutos, antes da refrigeração a 4°C, retardou a iniciação do escurecimento da casca dos frutos por, no máximo, quatro dias (PROMYOU; KETSA; VAN DOORN, 2008). Diante disso, fica evidente que, no caso da banana, a indução de tolerância ao frio promovida pelo tratamento térmico é temporária, e seus benefícios são restritos a poucos dias após a refrigeração, possivelmente devido a sua alta sensibilidade ao frio (PANTASTICO, 1990).

Como implicações diretas da baixa temperatura podem ser evidenciadas alterações no metabolismo normal dos frutos, as quais precedem os sintomas visuais e normalmente estão associadas a acréscimos na atividade respiratória, síntese de etileno e perda da funcionalidade das membranas celulares (WANG, 1982; KISLYUK; MIROSLAVOV; PALEEVA, 1995).

Durante o armazenamento refrigerado de bananas, a atividade respiratória e a síntese de etileno mantiveram-se baixas em todos os tratamentos, não havendo significativas alterações nos padrões de produção desses gases que pudessem ser relacionadas à intensificação das injúrias de frio (Figuras 2A e 3A). Em contrapartida, quando os frutos foram removidos da refrigeração e expostos à temperatura ambiente, tanto a produção de CO₂ quanto a síntese de C₂H₄ foram intensificadas (Figuras 2B e 3B). De acordo com Zhou; Ben-Arie; Lurie (2001), o tempo de exposição dos tecidos à baixa temperatura pode ser decisivo na resposta que o etileno e a respiração exibirão após a remoção da refrigeração (Figura 2B). Geralmente, a respiração e a produção de etileno são intensificadas após a remoção dos frutos de temperaturas indutoras de *chilling* (LYONS, 1973; NING et al., 1992; SCHIRRA, 1993, McCOLLUM et al., 1995). Em bananas, Pantastico et al. (1967) relataram que a respiração dos frutos foi afetada diretamente pelo prolongamento da exposição ao frio, sendo intensificada ou inibida a curto ou longo prazo, respectivamente.

A intensificação dos sintomas de *chilling* tem sido associada a acréscimos na produção de etileno, a qual pode exibir um súbito incremento após exposição à temperatura ambiente seguida de acentuada redução à medida que o dano evolui (WOOLF et al., 1997; McCOLLUM; McDONALD, 1991; SCHIRRA, 1993; McCOLLUM et al., 1995).

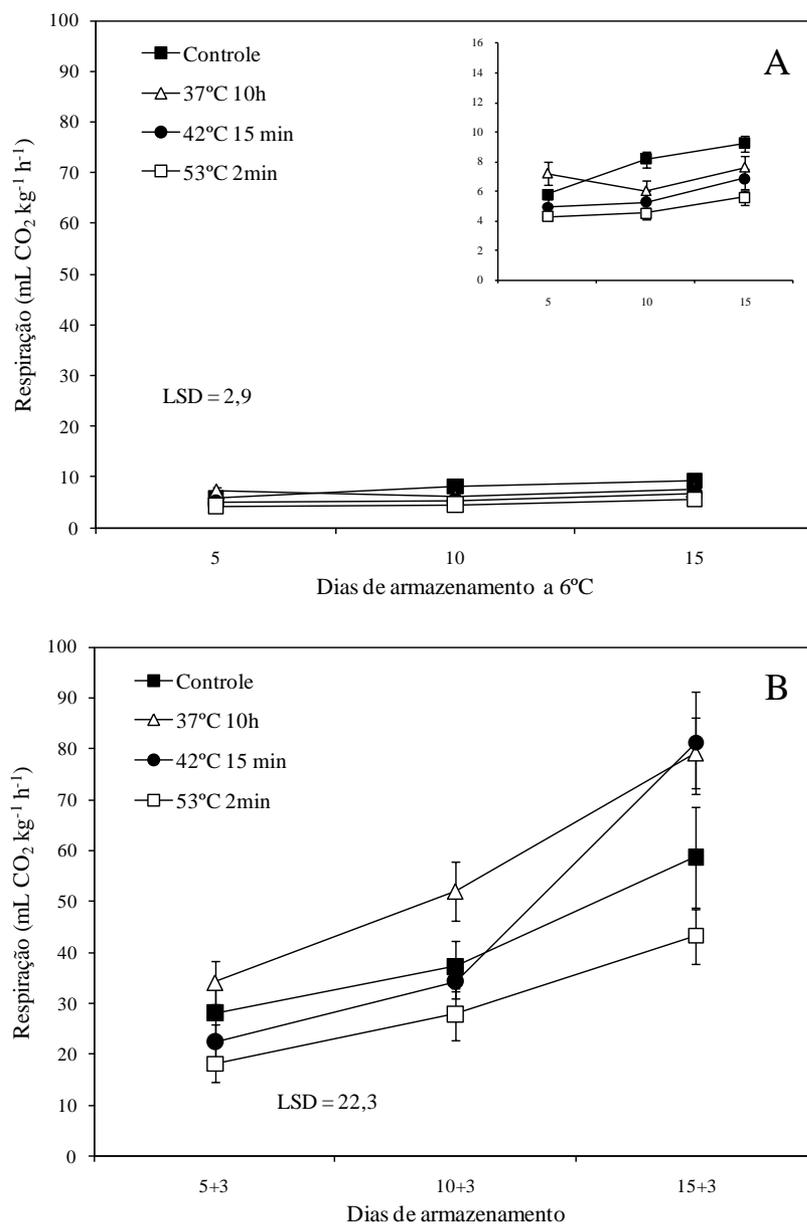


Figura 2 - Atividade respiratória de bananas 'Nanicão' durante o armazenamento a 6°C (A) e após a remoção dos frutos da refrigeração aos 5, 10 e 15 dias seguida de 3 dias a 20°C (B). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD ($p < 0,05$)

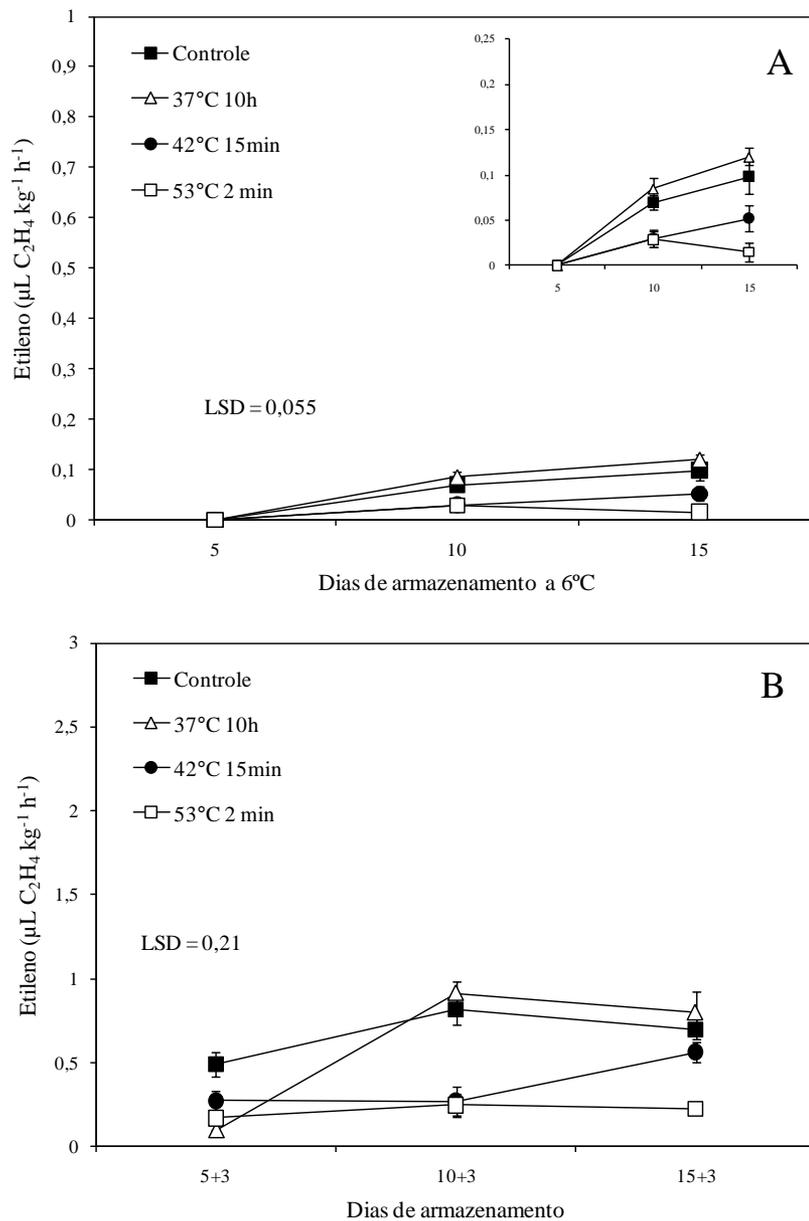


Figura 3 - Síntese de etileno de bananas ‘Nanicão’ durante o armazenamento a 6°C (A) e após a remoção dos frutos da refrigeração aos 5, 10 e 15 dias seguida de 3 dias a 20°C (B). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD ($p < 0,05$)

Nesse estudo, a evolução na síntese de etileno, após a remoção da refrigeração, foi suprimida nos frutos tratados com água quente, pois a produção manteve-se baixa em praticamente todos os períodos avaliados (Figura 3B). Nos frutos controle e nos condicionados a 37°C, a evolução na síntese do etileno foi pequena e não precedeu à exteriorização dos sintomas. Segundo Inaba et al. (2007), na banana existe um diferente mecanismo de retroalimentação do etileno que opera na polpa e na casca, o que pode explicar a ausência de relação entre a evolução na síntese de etileno e a exteriorização dos sintomas na casca. Dessa forma, possivelmente a produção de etileno verificada nos frutos intactos foi proveniente da polpa e não da casca (DOMÍNGUEZ; VENDRELL, 1993).

De modo a buscar um melhor entendimento do efeito dos tratamentos térmicos sobre a síntese de etileno e sua possível relação com a sensibilidade da banana às injúrias de frio, foram avaliados parâmetros relacionados à síntese e ao metabolismo do etileno na casca dos frutos após a remoção da refrigeração e posterior exposição dos tecidos à temperatura ambiente aos 5, 10 e 15 dias.

A capacidade de conversão do ACC exógeno suprido aos discos de casca dos frutos condicionados a 37°C foi levemente intensificada aos 5+3 dias em relação ao controle, porém nas avaliações subsequentes verificou-se que a capacidade de conversão do ACC em etileno, por meio da enzima ACO, foi reduzida nesses tratamentos, possivelmente devido à intensificação do dano de frio na casca dos frutos (Figura 4A). Por outro lado, na casca dos frutos tratados termicamente com água a 42°C por 15 minutos, houve inicialmente pequena inibição com posterior retomada da capacidade de conversão do ACC em etileno, similar a observada na casca dos frutos tratados com 53°C por 2 minutos aos 10+3 dias. Ao final do armazenamento, a atividade *in vivo* da ACO diminuiu em todos os tratamentos em relação aos 10+3 dias, porém essa redução foi mais pronunciada no controle e nos frutos condicionados a 37°C (Figura 4A).

Na ocasião da colheita, embora os frutos tivessem alcançado a maturidade fisiológica, foram detectados apenas traços de etileno. Ainda, nesses frutos, a atividade *in vitro* da ACO não foi detectada e o conteúdo de ACC livre na casca foi aproximadamente sete vezes inferior ao conteúdo malonilado (MACC), o que pode explicar, em parte, a baixa síntese de etileno observada tanto antes da aplicação dos tratamentos quanto nos primeiros dias em ambiente refrigerado (Figuras 4B, 5A e 5B).

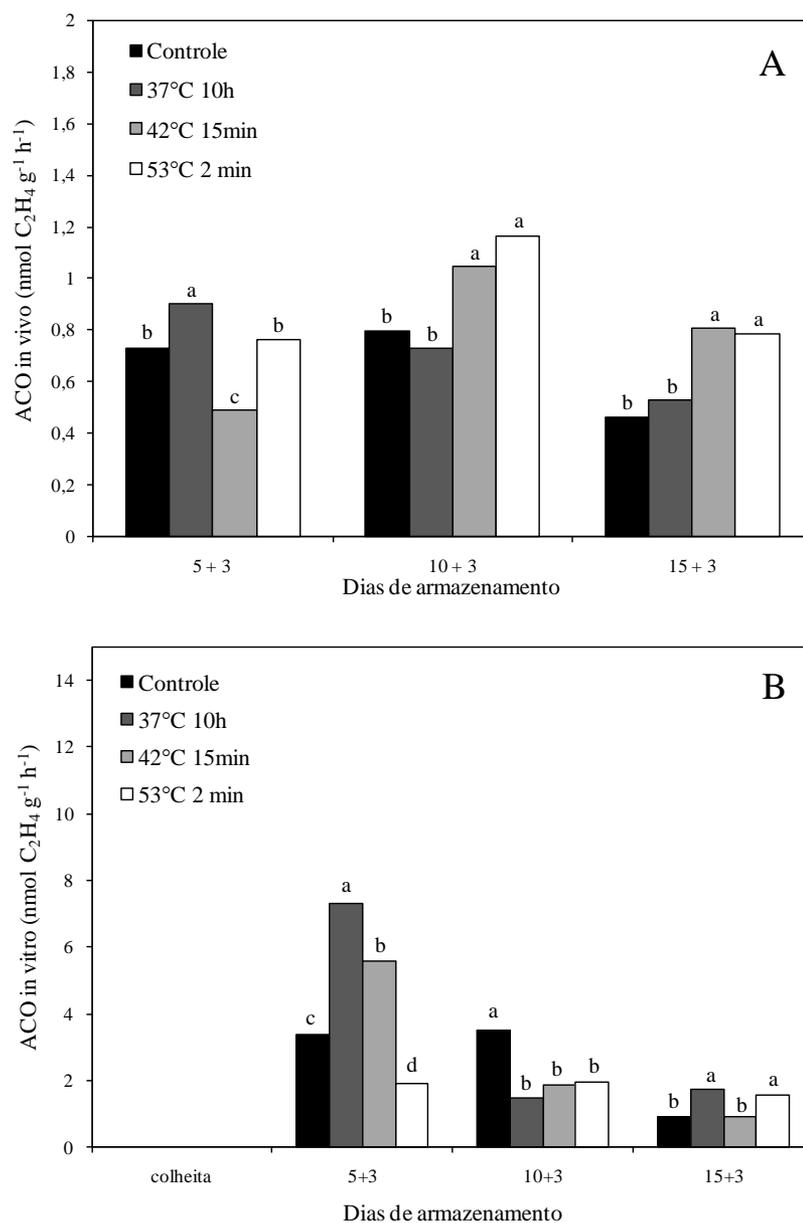


Figura 4 - Atividade *in vivo* (A) e *in vitro* (B) da ACO na casca de bananas ‘Nanicão’ após 5, 10 e 15 dias a 6°C seguida de 3 dias a 20°C. Tratamentos seguidos pela mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$)

Em resposta ao estresse térmico, representado pela sequência de aquecimento, refrigeração e reaquecimento dos frutos, houve intensificação da atividade *in vitro* da ACO em todos os tratamentos após 5 dias de armazenamento a 6°C mais 3 dias a 20°C (Figura 4B). Essa elevação foi acompanhada de um subsequente decréscimo, aos 10+3 dias, na atividade da ACO na casca

dos frutos submetidos ao condicionamento ou à imersão em água a 42°C por 15 minutos. Possivelmente, a elevação inicial na atividade *in vitro* da ACO tenha sido consequência direta do estresse promovido pelo condicionamento a 37°C e pela imersão a 42°C por 15 minutos (CHAN, 1986).

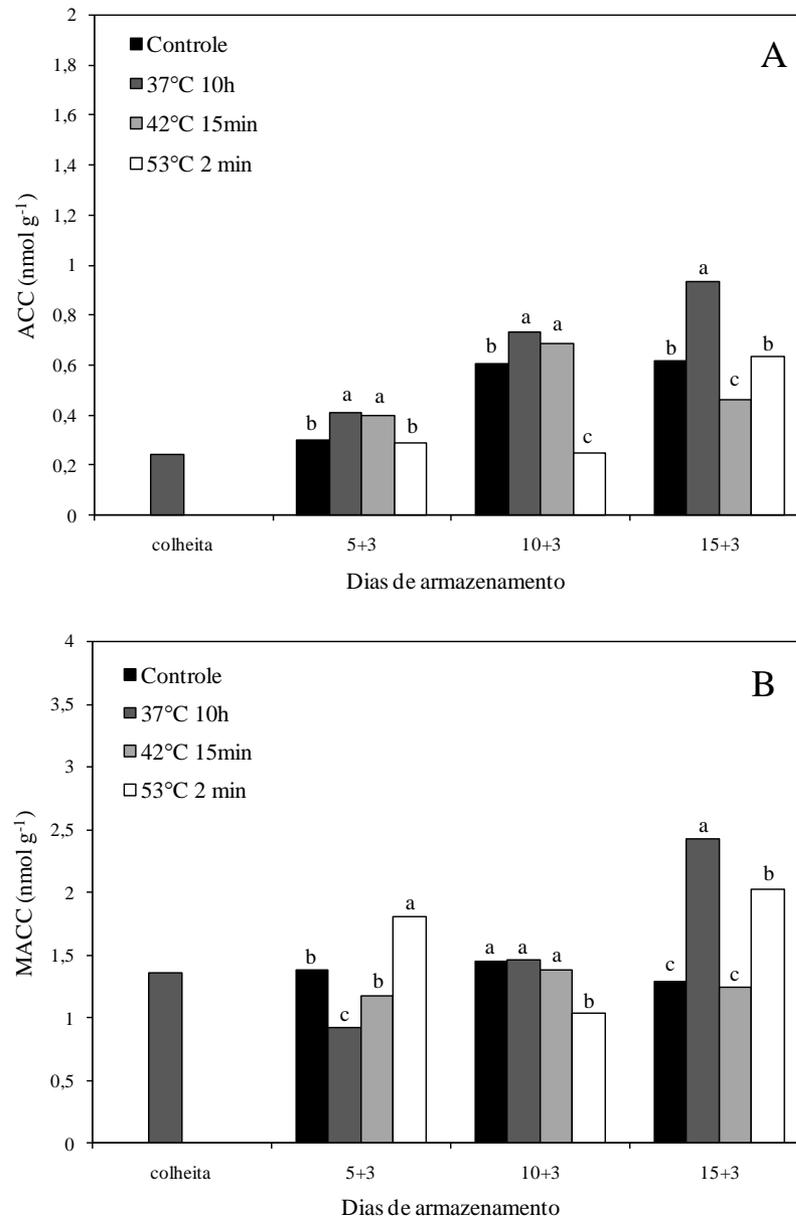


Figura 5 - Conteúdo de ACC livre (A) e malonilado (B) na casca de bananas ‘Nanicão’ na colheita e após 5, 10 e 15 dias a 1°C seguido de 3 dias a 20°C. Tratamentos seguidos pela mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$)

Contrariamente, a exposição de bananas a 53°C por 2 minutos resultou em pronunciado efeito inibitório sobre a atividade dessa enzima durante todo o armazenamento. O aparente comprometimento da conversão do ACC em etileno decorrente da intensificação das injúrias de frio pode explicar o crescente acúmulo de ACC, tanto livre quanto malonilado na casca, com o avanço do armazenamento (Figuras 5A e 5B). Além disso, o armazenamento dos frutos em baixa temperatura também pode ter contribuído para a diminuição da capacidade de conversão do ACC em etileno (WANG; ADAMS, 1982), possivelmente devido à atividade da ACO depender de alguma forma da integridade das membranas (ANDERSEN et al., 1986; RAMASSAMY et al., 1998; ANTUNES; SFAKIOTAKIS, 2002).

A manutenção da estabilidade das membranas é crucial, tanto do ponto de vista da compartimentação de enzimas e substratos responsáveis por reações de escurecimento quanto do metabolismo energético (TOIVONEN, 1992; KISLYUK; MIROSLAVOV; PALEEVA, 1995; ZYKOVA; KOLESNICHENKO; VOINIKOV, 2002). Alterações na conformação e estrutura das membranas celulares têm sido relatadas como o evento inicial que desencadeia as injúrias de frio em inúmeros casos, possivelmente por influenciarem a seletividade das membranas e atividade de complexos enzimáticos associados a ela (LYONS, 1973; RAISON; ORR, 1990; DE SANTIS et al., 1999). Neste estudo, o vazamento de íons e o conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram usados como critério para avaliar o dano provocado às membranas celulares presentes na casca dos frutos submetidos ao frio.

De maneira geral, não foram observadas grandes alterações no percentual de vazamento de íons e na peroxidação de lipídios da casca dos frutos durante o período avaliado (Figura 6A e 6B). Mesmo assim, o percentual de vazamento de íons observado nos frutos tratados termicamente por imersão permaneceu levemente inferior ao apresentado pelos demais tratamentos, exceto aos 5+3 dias quando o percentual foi similar ao dos frutos condicionados a 37°C por 10 horas. Além disso, o aumento no vazamento de íons demonstrou estar positivamente relacionado ao acúmulo de TBARS no tecido, indicando que a alteração nas membranas causada pelo frio foi principalmente devido à ação de radicais livres (Figuras 6B e 7). Em bananas ‘Gros Michel’ tratadas termicamente e armazenadas a 4°C, o menor escurecimento da casca, indicativo de injúrias de frio, foi associado diretamente à menor atividade da lipoxigenase (LOX) e ao menor acúmulo de produtos da peroxidação lipídica (PROMYOU; KETSA; VAN DOORN, 2008). Contudo, nesse

mesmo estudo, os autores sugeriram que tanto os níveis de peroxidação quanto a atividade da LOX não representaram adequadamente a intensificação do escurecimento da casca nos frutos.

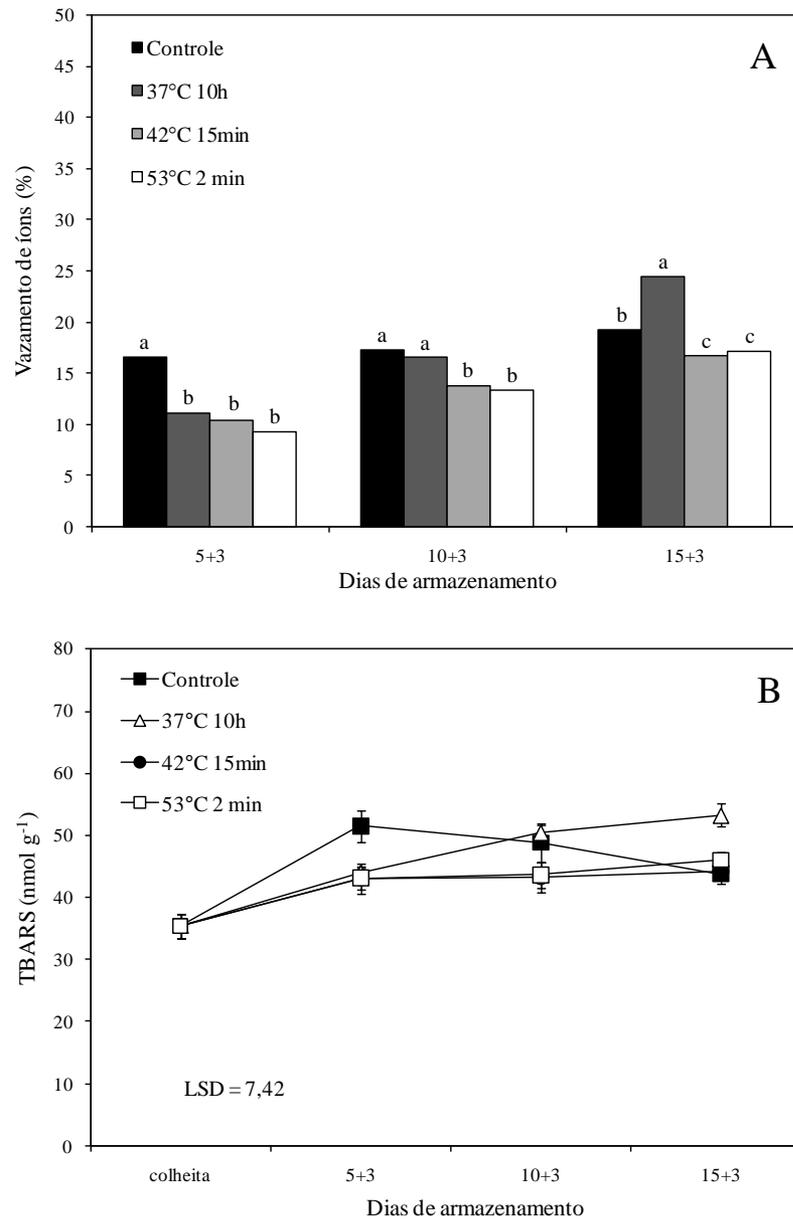


Figura 6 - Vazamento de íons (A) e conteúdo de TBARS (B) na casca de bananas ‘Nanicão’ após 5, 10 e 15 dias a 6°C seguido de 3 dias a 20°C. Em (A) tratamentos seguidos pela mesma letra, em cada período, não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$). Em (B) as barras verticais indicam o erro padrão ($n=4$). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD ($p < 0,05$)

Em conformidade com estudos realizados anteriormente em plantas (PURVIS; SHEWFELT, 1993) e frutos (HARIYADI; PARKIN, 1991; SALA, 1998), verificou-se que a exposição de bananas à temperatura indutora de *chilling* intensificou a geração de espécies reativas de oxigênio nos tecidos. Adicionalmente, a temperatura e o tempo de exposição dos frutos aos tratamentos térmicos influenciaram significativamente a geração e o acúmulo de radicais livres, especialmente o superóxido, o que repercutiu na diferencial tolerância dos frutos a baixa temperatura.

A geração de radicais superóxido na casca dos frutos condicionados a 37°C por 10 horas foi intensificada em até seis vezes durante os primeiros 10+3 dias de armazenamento. Em contraste, o tratamento térmico dos frutos (42°C por 15 minutos ou 53°C por 2 minutos) evitou a superprodução de O_2^- , diminuindo, portanto, a intensificação do estresse oxidativo nesses frutos (Figura 7).

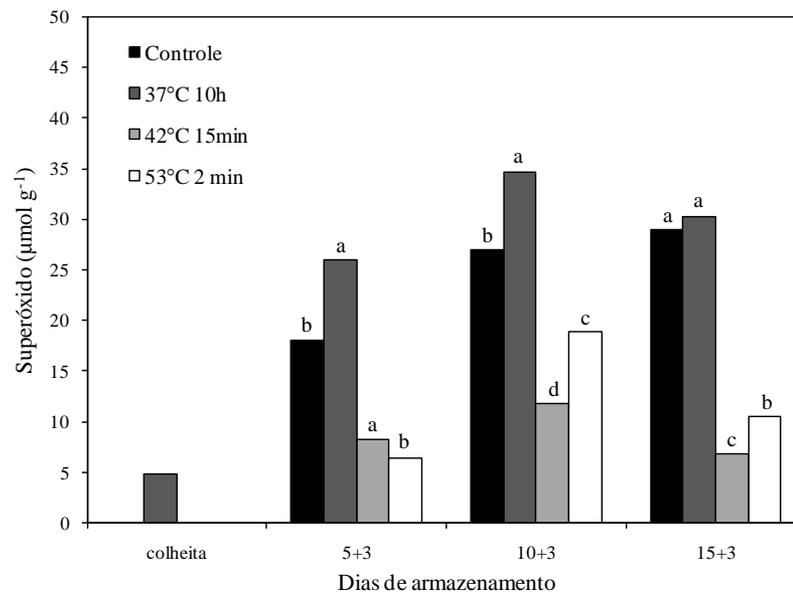


Figura 7 - Conteúdo de radicais superóxido na casca de bananas 'Nanicão' na colheita e após 5, 10 e 15 dias a 6°C seguido de 3 dias a 20°C. Tratamentos seguidos pela mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$)

A geração de radicais livres é um processo comum e acontece constantemente durante o metabolismo celular aeróbico (MITTLER, 2002). Entretanto, essas espécies reativas tornam-se potencialmente danosas às células quando o equilíbrio entre a geração e a remoção é perdido (NOCTOR; FOYER, 1998). A superóxido dismutase (SOD) atua convertendo o O_2^- em peróxido

de hidrogênio e oxigênio, representando, assim, a primeira linha de defesa contra as EROs (ALSHER; ERTURK; HEATH, 2002).

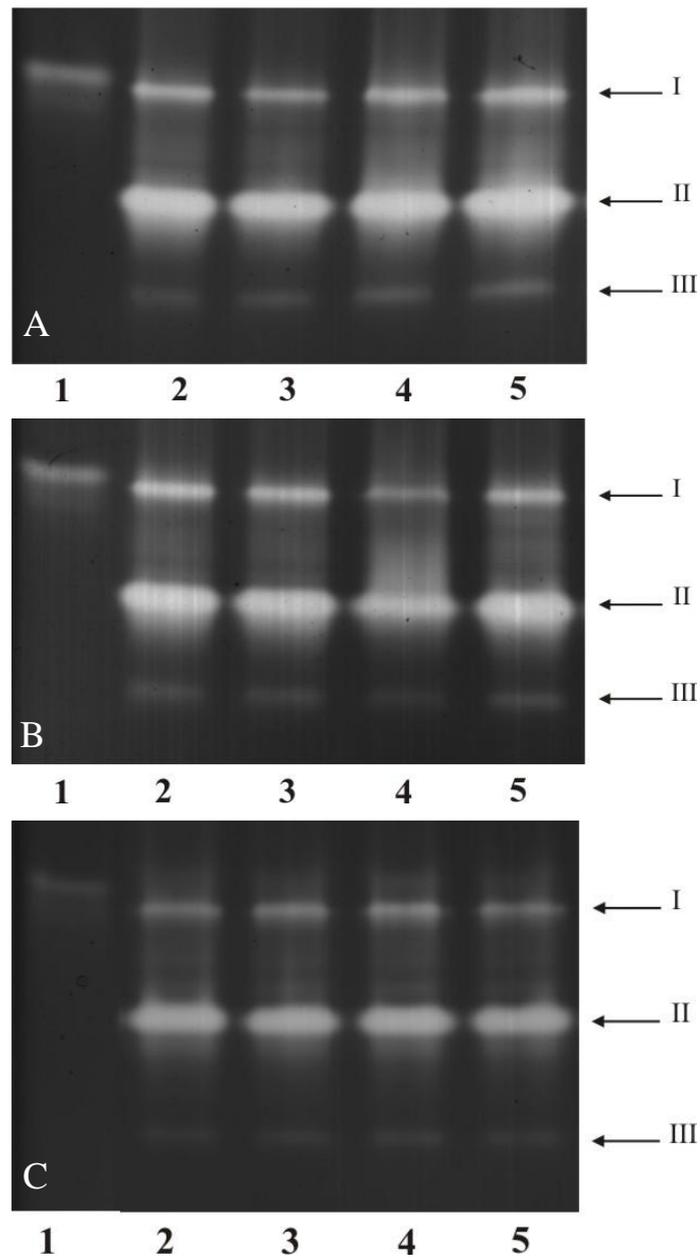


Figura 8 - Atividade da superóxido dismutase em gel de poliacrilamida não desnaturante aos 5 (A), 10 (B) e 15 (C) dias a 6°C (+3 dias a 20°C). (1) padrão de SOD bovina, (2) controle, (3) 37°C por 10 horas, (4) 42°C por 15 minutos e (5) 53°C por 2 minutos. As setas laterais representam as isoformas de SOD presentes na casca da banana

Na casca das bananas, a atividade da SOD foi determinada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante, a qual revelou a existência de três isoformas, representadas pelas bandas I, II e III (Figura 8). Até o presente momento nenhum trabalho havia relato a presença de isoformas da SOD na casca da banana. Em plantas, três classes distintas de SOD já foram detectadas e classificadas de acordo com o metal presente em seu sítio ativo; Fe, Mn ou Cu/Zn (ALSHER; ERTURK; HEATH, 2002). Porém, em monocotiledôneas, como o caso da banana, apenas a Cu/ZnSOD cloroplástica e a MnSOD mitocondrial foram encontradas (WU et al., 1999).

De modo geral, não foram verificadas substanciais diferenças na intensidade das bandas que demonstrassem diferenças entre tratamentos durante o período avaliado. Entretanto, pode-se inferir que a isoforma II contribuiu em maior extensão para a atividade total da SOD na casca dos frutos durante o armazenamento (Figura 8). Acréscimos na atividade da SOD têm sido associados à maior tolerância de plantas e frutos a variados tipos de estresse, incluindo o *chilling*, devido a esta enzima combater a superprodução de radicais superóxido gerados em resposta ao estresse (BOWLER et al., 1992; SALA, 1998; GRATÃO et al., 2005). Assim, como relatado em outros estudos, não foi verificado acréscimo na atividade da SOD, mas sim manutenção da atividade ao longo do armazenamento (WANG, 1995; RIVERA et al., 2004), indicando que os radicais estavam sendo removidos do tecido.

O conteúdo de peróxido de hidrogênio aumentou drasticamente nos primeiros dias de armazenamento (5+3 dias) em todos os tratamentos, se comparado ao conteúdo verificado na colheita, porém permaneceu praticamente constante em seguida nos 10 e 15+3 dias (Figura 9). O conteúdo de H₂O₂ nos tecidos vegetais é regulado pela ação coordenada de enzimas geradoras como a SOD e de removedoras como a CAT, APX e GR (KANG et al., 2003).

O peróxido de hidrogênio, por ser mais estável do que as demais EROs e poder se difundir através das membranas biológicas, pode ser potencialmente mais danoso que o superóxido (PRASAD et al., 1994; ASADA, 1999). Dessa forma, é importante que sua remoção pelo sistema antioxidante seja rápida de modo a evitar reações mais nocivas ao metabolismo celular como a geração do radical hidroxila (MITTLER, 2002).

Nesse trabalho, as enzimas antioxidantes envolvidas no metabolismo do H₂O₂ apresentaram diferentes respostas aos tratamentos térmicos e frente ao estresse pelo frio (Figuras 10, 11 e 12).

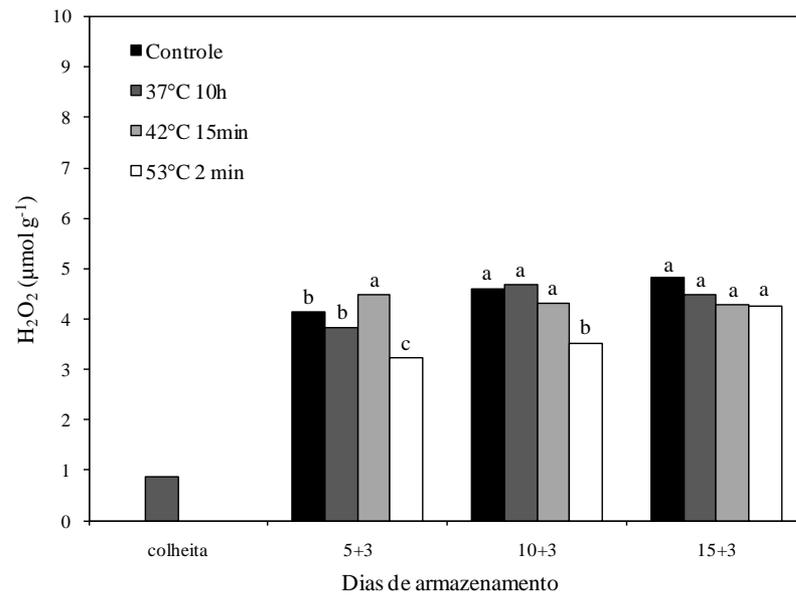


Figura 9 - Conteúdo de peróxido de hidrogênio na casca de bananas ‘Nanicão’ na colheita e após 5, 10 e 15 dias a 6°C seguido de 3 dias a 20°C. Tratamentos seguidos pela mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$)

A imersão dos frutos em água (53°C por 2 minutos) induziu acréscimo de aproximadamente 2,5 vezes na atividade da CAT em relação ao controle após 5 dias a 6°C (+3 dias a 20°C). Nestes frutos, a elevação na atividade da CAT coincidiu com o aparecimento dos sintomas de *chilling* e foi acompanhada por menor acúmulo de H₂O₂ na casca após o reaquecimento dos frutos aos 5 e 10 dias. Em contraste, nos frutos controle e nos condicionados a 37°C a atividade da CAT permaneceu extremamente baixa durante todo o armazenamento (Figura 10).

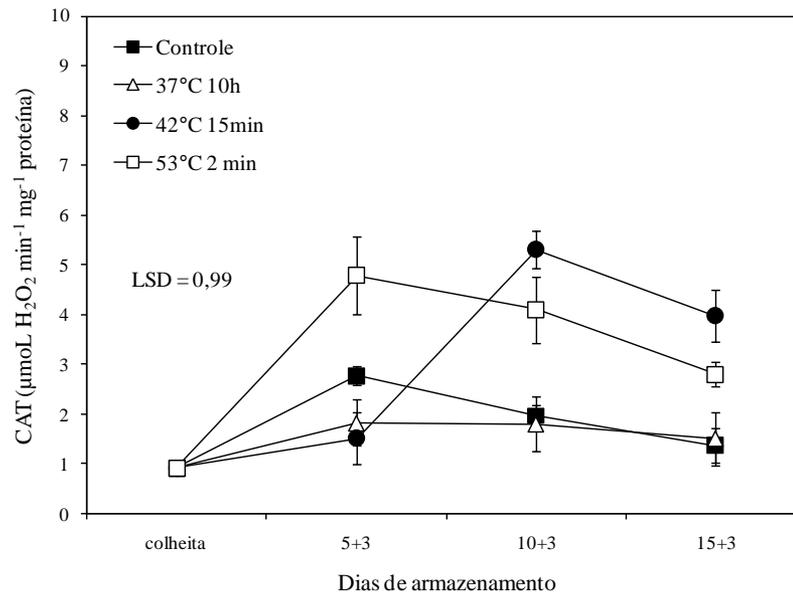


Figura 10 - Atividade específica da CAT na casca de bananas ‘Nanicão’ na colheita e após 5, 10 e 15 dias a 6°C seguido de 3 dias a 20°C. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD ($p < 0,05$)

A ascorbato peroxidase (APX), assim como a CAT, desempenham importante papel na remoção do H₂O₂ (MITTLER, 2002). Todavia, nesse estudo, nenhuma diferença significativa na atividade da APX foi observada na casca dos frutos controle em relação aos tratados termicamente. Além disso, a atividade da APX diminuiu paulatinamente em todos os frutos com o avanço do armazenamento (Figura 11).

O potencial da APX em metabolizar o H₂O₂ também depende do estado redox do ascorbato e da glutathiona (FOYER et al., 1994). Durante a remoção do H₂O₂ a glutathiona reduzida (GSH) é oxidada (GSSG), e a GSH é regenerada pela atividade da glutathiona redutase (GR) a qual é dependente de NADPH, mantendo assim o *pool* de GSH no estado reduzido (GAMBLE; BURKE, 1984; NOCTOR et al., 1998). Com exceção do acréscimo observado aos 5 dias a 6°C (+3 dias a 20°C) em relação a colheita, a atividade da GR apresentou padrão de atividade similar ao verificado na APX (Figuras 11 e 12).

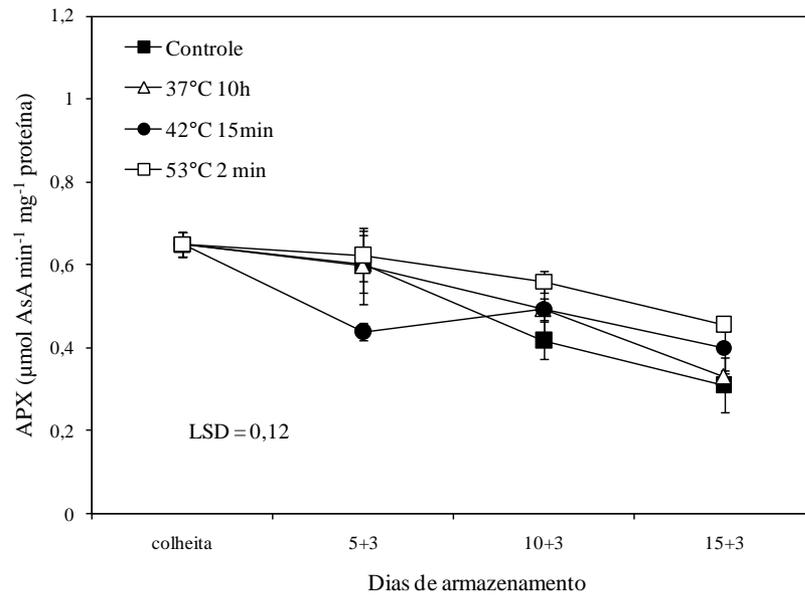


Figura 11 - Atividade específica da APX na casca de bananas ‘Nanicão’ na colheita e após 5, 10 e 15 dias a 6°C seguida de 3 dias a 20°C. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD ($p < 0,05$)

Esses resultados permitem inferir que, nas condições em que o presente estudo foi realizado, tanto a APX quanto a GR não demonstraram desempenhar significativo papel na resposta da banana ao dano de frio. Contudo, a contribuição dessas enzimas para a remoção do H_2O_2 e diminuição do estresse oxidativo não pode ser descartada. Estudos realizados anteriormente sugerem que a CAT é a principal enzima antioxidante envolvida no mecanismo de defesa de tangerinas e laranjas contra o dano de frio (SALA; LAFUENTE, 2000; SALA et al., 2005). Em bananas, tal afirmação não pode ser completamente descartada, porém outros fatores devem ser considerados.

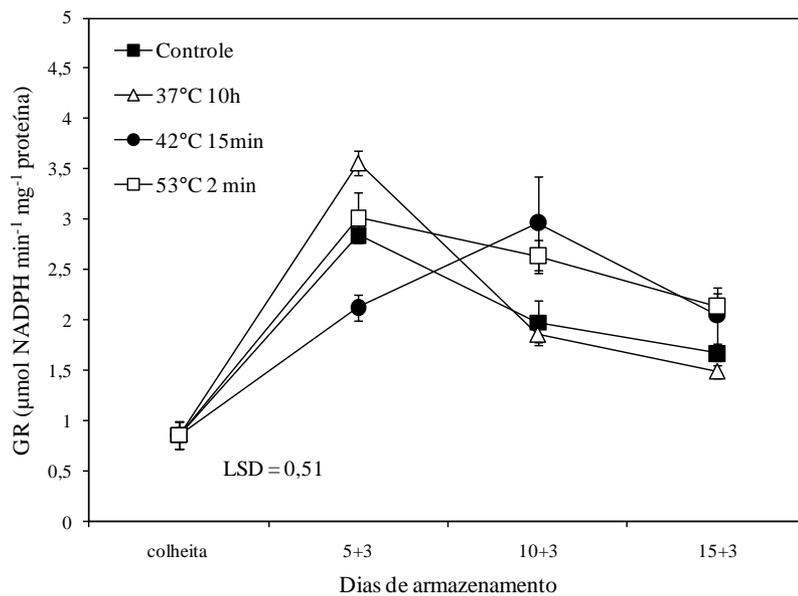


Figura 12 - Atividade específica da GR na casca de bananas ‘Nanicão’ na colheita e após 5, 10 e 15 dias a 6°C seguida de 3 dias a 20°C. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD ($p < 0,05$)

2.4.4 Conclusões

O estresse ocasionado pelo condicionamento dos frutos a 37°C aumentou a geração de radicais superóxido na casca favorecendo a intensificação dos sintomas de *chilling*.

A imersão de bananas em água a 42°C por 15 minutos ou 53°C por 2 minutos aumenta a tolerância dos frutos à temperatura de 6°C por no máximo 15 dias.

2.5 Experimento 4

A inibição da percepção do etileno retarda o desenvolvimento das injúrias de frio em bananas ‘Nanicão’

2.5.1 Material e Métodos

Bananas ‘Nanicão’, provenientes de um pomar comercial localizado no município de Tietê, SP, foram colhidas em estágio de maturação fisiológica. Após a colheita dos cachos e despenca, os frutos foram transportados até o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Pós-Colheita do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ, em Piracicaba, SP.

Inicialmente procedeu-se à remoção dos frutos das pencas, descartando-se àqueles com danos mecânicos e manchas na casca. Com objetivo de evitar o desenvolvimento de podridões que poderiam influenciar a síntese de etileno e comprometer a avaliação visual dos sintomas das injúrias de frio, os frutos foram imersos, durante 5 minutos, em solução fungicida com Prochloraz 300 μ L L⁻¹, utilizando o produto comercial Sportak[®]. Em seguida, procedeu-se uma nova seleção dos frutos e, a seguir, foi realizada a homogeneização das amostras experimentais e aplicação dos seguintes tratamentos:

Tratamento 1- Armazenamento a 6°C;

Tratamento 2- Exposição dos frutos a 1000nL L⁻¹ de 1-metilciclopropeno.

Para a aplicação de 1-MCP utilizou-se o produto Smart-Fresh[®] (0,14% de 1-MCP na formulação pó). O produto foi solubilizado em 15mL de água a 25°C em um recipiente hermético e, posteriormente, a solução foi transferida para uma placa de petri, já no interior de uma caixa a qual foi fechada imediatamente. Os frutos ficaram expostos ao tratamento por 12 horas a 25°C e, a seguir, estes frutos, juntamente com os que compunham o controle, foram armazenados a 6°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) e 90% ($\pm 5\%$) de UR durante 15 dias. Ao final de cada período de armazenamento (5, 10 e 15 dias), parte dos frutos foi removida da refrigeração e exposta à temperatura de 20°C durante 3 dias.

A incidência de injúrias de frio, a taxa respiratória e a síntese de etileno foram determinadas durante o armazenamento refrigerado e ao final de cada período a 20°C. Procedeu-se também à retirada de amostras da casca dos frutos para a determinação da atividade *in vivo* da ACC oxidase

e vazamento de íons apenas ao final de cada período a 20°C. Nesta ocasião foram congeladas amostras de casca de cada repetição para as demais avaliações realizadas, as quais estão descritas a seguir:

- a) **Índice de injúrias de frio:** a incidência foi determinada pelo grau de escurecimento da casca das bananas, de acordo com a escala proposta por Kondo et al. (2005), onde: [0] sem dano; [1] <25%; [2] 25-50% e [3] >50% da superfície da casca afetada.
- b) **Respiração:** aproximadamente quinhentos gramas de frutos de cada repetição foram transferidos para recipientes com volume de 1.700mL. Estes foram fechados hermeticamente durante 2 horas. Para a análise da produção de CO₂, foi injetada uma alíquota de 0,5mL de cada recipiente, em cromatógrafo a gás, marca Thermofinigan, modelo Trace GC Ultra, equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna de aço inox de 1/8” e 4,0m de comprimento, preparada com Porapak N 50/80. Como gás de arraste, utilizou-se o hidrogênio a um fluxo de 25mL min⁻¹. A temperatura da coluna, injetor e detector foram de 110, 140 e 200°C, respectivamente. Os resultados foram expressos em mL CO₂ kg⁻¹ h⁻¹, calculados em função da concentração de CO₂ presente no recipiente, da massa de frutos, do volume livre do recipiente e do tempo de fechamento do recipiente.
- c) **Síntese de etileno:** dos mesmos recipientes usados para a mensuração da respiração retirou-se uma alíquota de 0,5mL a qual foi injetada em cromatógrafo a gás, marca Thermofinigan, modelo Trace GC Ultra, equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna de aço inox de 1/8” e 1,8m de comprimento, preparada com Porapak N 50/80. Como gás de arraste, utilizou-se o hidrogênio a um fluxo de 25mL min⁻¹. A temperatura da coluna, injetor e detector foram de 110, 140 e 200°C, respectivamente. Os resultados foram expressos em síntese de etileno (µL C₂H₄ kg⁻¹ h⁻¹), calculada com base na concentração de etileno no interior do recipiente, na massa de frutos, no volume livre do recipiente e no tempo de fechamento do recipiente.
- d) **Atividade *in vivo* da ACC oxidase (ACO):** determinada de acordo com a metodologia proposta por Liu et al. (1999). Discos de casca dos frutos foram lavados com água deionizada duas vezes. Após serem secos com papel filtro, os discos (1,0g) foram incubados em solução contendo tampão tricina 0,1M (pH 7,5), manitol 0,4M e

ACC 1mM. Os discos de casca permaneceram incubados por uma hora na referida solução e a seguir foram secos em papel filtro e imediatamente acondicionados em frascos herméticos de 40mL e incubados a 30°C. Depois de uma hora a concentração de etileno presente nos frascos foi determinada e os valores expressos em $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

- e) **Atividade *in vitro* da ACC oxidase (ACO, EC 1.14.17.4):** determinada de acordo com a metodologia proposta por Moya-Leòn e John (1994), com modificações. Amostras de casca congelada foram pulverizadas em moinho com nitrogênio líquido. A seguir, aproximadamente um grama do tecido foi homogeneizado em tampão de extração contendo Tris-HCl 100mM pH 7,5; 5mM DTT; glicerol 10% (w/v); 30mM ascorbato de sódio e PVPP 4% (p/v). A seguir, o homogeneizado foi filtrado com gaze e centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C. O ensaio foi realizado incubando-se 1,0mL do sobrenadante contendo a enzima com 2,0mL da solução de reação contendo tampão tricina 0,1M pH 7,5; 0,1mM FeSO₄; 1mM ACC; 20mM NaHCO₃ e 30mM ascorbato de sódio. Após incubação da solução a 30°C em frasco hermético por 30 minutos a concentração de etileno presente nos frascos foi determinada e os valores expressos em $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.
- f) **Conteúdo de ACC livre (ACC) e malonilado (MACC):** foi mensurado segundo o método proposto por Lizada e Yang (1979) e modificado por Fils-Lycaon et al. (2008). Amostras de casca congelada foram pulverizadas em moinho com nitrogênio líquido. A seguir, o tecido foi homogeneizado em etanol 70% e aquecido a 100°C por 30 minutos e em seguida filtrado com gaze. O extrato resultante foi evaporado e o resíduo resultante ressuspenso em água. O sobrenadante foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos para clarear o extrato e o ACC livre foi quimicamente transformado em etileno, conforme descrito anteriormente (LIZADA; YANG, 1979). O conteúdo de MACC foi determinado em extrato hidrolisado com HCl a 100°C por uma hora e neutralizado com NaOH (HOFFMAN et al., 1982). O extrato hidrolisado foi usado para determinação do conteúdo de ACC, de acordo com Lizada e Yang (1979). A diferença entre o conteúdo de ACC antes e após a hidrólise representa o conteúdo de MACC no extrato (HOFFMAN et al., 1983). Os resultados foram expressos em $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ tecido}$.

- g) Vazamento de íons:** foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Vieira Santos et al. (2001). Discos de casca dos frutos foram lavados com água deionizada duas vezes. Após serem secos com papel filtro, os discos (2,0g) foram acondicionados em frascos com 50mL de solução 0,4M de manitol. Os frascos foram mantidos sob agitação moderada por 3 horas quando então, foi medida a condutividade elétrica da solução a 25°C ($L_{inicial}$). A solução contida nos frascos foi congelada por 18 horas e após este período foi descongelada e novamente procedeu-se à medida da condutividade elétrica a 25°C (L_{final}). Os valores obtidos foram calculados por meio da fórmula $VI = (L_{final} - L_{inicial}) / L_{final} \times 100$ e expressos em condutividade relativa.
- h) Peroxidação lipídica:** foi determinada pela medição da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito previamente (BUEGE; AUST, 1978; DHINDSA; MATOWE, 1981). Um grama de tecido foi triturado em nitrogênio líquido e posteriormente homogeneizado em 5mL de ácido tricloroacético (TCA) (0,1%), juntamente com 20% de PVPP. Após completa homogeneização, o material foi centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos. Do sobrenadante foi retirado uma alíquota de 1,5mL a qual se adicionou 4mL de TCA (20%) contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico (TBA). A mistura foi aquecida a 95°C por 30 minutos, e rapidamente resfriada em banho de gelo. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 10.000 x g por 5 minutos para clarear o extrato e imediatamente a absorbância das TBARS formadas foi determinada em espectrofotômetro a 535nm. As medidas foram corrigidas para turbidez inespecífica pela subtração da absorbância a 600nm. A concentração das TBARS foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 155mM cm^{-1} .
- i) Peróxido de hidrogênio (H_2O_2):** o conteúdo de peróxido de hidrogênio na casca foi determinado de acordo com o método proposto por Gay et al. (1999) e Hermes-Lima et al. (1995), com modificações. Um grama de tecido foi triturado em nitrogênio líquido e posteriormente homogeneizado em 10mL de metanol a 0°C. Após a completa homogeneização as amostras foram centrifugadas 10.000 x g por 10 minutos. A seguir retirou-se uma alíquota de 30 μL do sobrenadante, à qual se adicionou 500 μL de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ 1mM e 200 μL de H_2SO_4 250mM. A mistura permaneceu em reação por 5 minutos no escuro. Em seguida adicionou-se 100 μL de xilenol laranja 1mM e a

mistura foi mantida no escuro por 20 minutos quando então procedeu-se à leitura da absorbância das amostras a 560nm. As leituras foram comparadas com uma curva padrão com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio.

- j) Radicais superóxido (O_2^-):** o conteúdo de radicais superóxido foi medido espectrofotometricamente a 490nm pela oxidação da epinefrina a adrenocromo (MISRA; FRIDOVICH, 1972; MINIBAYEVA; BECKETT, 2001). A reação consistiu da adição de 50 μ L de extrato vegetal a 3,0mL de água pH 7,0 e 1mM epinefrina. Após a incubação sob agitação moderada por 20 minutos no escuro a reação foi parada adicionando-se 50 μ L de HCl 0,05N. Imediatamente procedeu-se à leitura da absorbância a 490nm. O conteúdo de radicais superóxido na casca foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar de 4,47mM cm^{-1} .
- k) Extração protéica:** em cada período de avaliação (5+3, 10+3 e 15+3), amostras da casca dos frutos de cada tratamento foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -30°C até o momento das análises. Aproximadamente um grama da casca congelada foi pulverizada em moinho com nitrogênio líquido. A seguir o tecido vegetal foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 100mM, pH 7,5; contendo 1mM de EDTA; 3mM de DTT e 4% (p/v) de PVPP. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e estocado em freezer a -30°C até o momento das análises.
- l) Atividade de Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1):** a atividade da SOD foi observada por meio de gel de poliacrilamida 12% não desnaturante (PAGE), conforme descrito em VITÓRIA et al. (2001). Cada gel permaneceu sob corrente elétrica de 20mA por 4 horas. Após a separação das proteínas, os géis foram enxaguados rapidamente em água destilada-deionizada e incubados durante 30 minutos no escuro à temperatura ambiente em uma solução contendo 50mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8; 1mM EDTA; 0,05mM riboflavina; 0,1mM NBT e 3% TEMED. Ao final de 30 minutos, a mistura de reação foi removida, os géis enxaguados com água destilada-deionizada e colocados sob iluminação por alguns minutos para foto-oxidação das bandas. Para cada gel foram utilizados 7 μ L de SOD bovina (Sigma) como padrão.
- m) Atividade de catalase (CAT, EC 1.11.1.6):** determinada conforme Azevedo et al. (1998), pela decomposição do peróxido de hidrogênio a 240nm durante um minuto em

uma reação contendo tampão fosfato de potássio 100mM pH7,5 e 2,5µL de peróxido de hidrogênio (30%). A reação foi iniciada pela adição de 50µL de extrato protéico.

- n) Atividade de Ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11):** foi determinada através do método descrito em Nakano e Asada (1981). A mistura da reação consistiu de 650µL de tampão fosfato de potássio 80mM pH 7,0; 100µL ascorbato (5mM); 100µL EDTA (1mM); 100µL H₂O₂ (1mM) e 30µL de extrato. A atividade foi determinada pela degradação do peróxido de hidrogênio durante um minuto, por alterações na absorbância a 290nm. A mistura de reação contendo tampão fosfato, ascorbato e EDTA permaneceu em banho-maria a 30°C. O peróxido de hidrogênio foi adicionado somente no início da leitura em espectrofotômetro.
- o) Atividade de glutatona redutase (GR, EC 1.6.4.2):** foi determinada espectrofotometricamente a 30°C, em uma mistura de reação, contendo tampão fosfato de potássio 100mM pH 7,5; 1mM 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB); 1mM glutatona oxidada (GSSG) e 0,1mM NADPH. A reação foi iniciada pela adição de 50µL de extrato. A GR foi estimada pela redução da glutatona oxidada, monitorada pela alteração da absorbância a 412nm (SMITH et al., 1988).
- p) Proteínas totais:** a concentração de proteínas foi determinada em espectrofotômetro a 595nm de acordo com Bradford (1976), utilizando-se o BSA como padrão.

2.5.2 Delineamento experimental e análise dos dados

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições de 10 frutos. Para as análises bioquímicas foram usadas triplicatas de cada repetição. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e, havendo diferenças, as médias foram comparadas pelo teste LSD (*Least Significant Difference*) a 5% de probabilidade de erro.

Os procedimentos estatísticos foram executados com auxílio do pacote estatístico SOC (Software Científico: NTIA/EMBRAPA).

2.5.3 Resultados e Discussão

Bananas são frutos de elevada sensibilidade ao frio e podem exibir sintomas característicos de *chilling* na casca, mesmo em temperaturas consideradas moderadas (PANTASTICO, 1990). No presente trabalho, o tratamento de bananas ‘Nanicão’ com 1000nL L⁻¹ de 1-MCP antes do armazenamento refrigerado a 6°C, manteve a incidência de frutos com casca escura, característica de *chilling*, significativamente inferior ao controle, mesmo após a remoção desses frutos da refrigeração seguida da exposição à temperatura ambiente por 3 dias (Figura 1). Embora tenha havido intensificação do escurecimento da casca com a exposição de ambos os frutos à temperatura ambiente verificou-se que, ao final do armazenamento, as diferenças entre os índices de injúrias dos frutos tratados com 1-MCP e do controle permaneceram. Dessa forma, o bloqueio da ação do etileno em bananas resultou em menor índice de escurecimento da casca por até 15 dias a 6°C mais 3 dias a 20°C, quando comparado aos frutos não tratados. Esses resultados estão em conformidade com outras investigações realizadas anteriormente e reforçam a hipótese de que o etileno pode desempenhar importante papel no desenvolvimento das injúrias de frio em frutos sensíveis (BEN-AMOR et al., 1999; ZHOU; BEN-ARIE; LURIE, 2001; PESIS et al., 2002; SALVADOR et al., 2004).

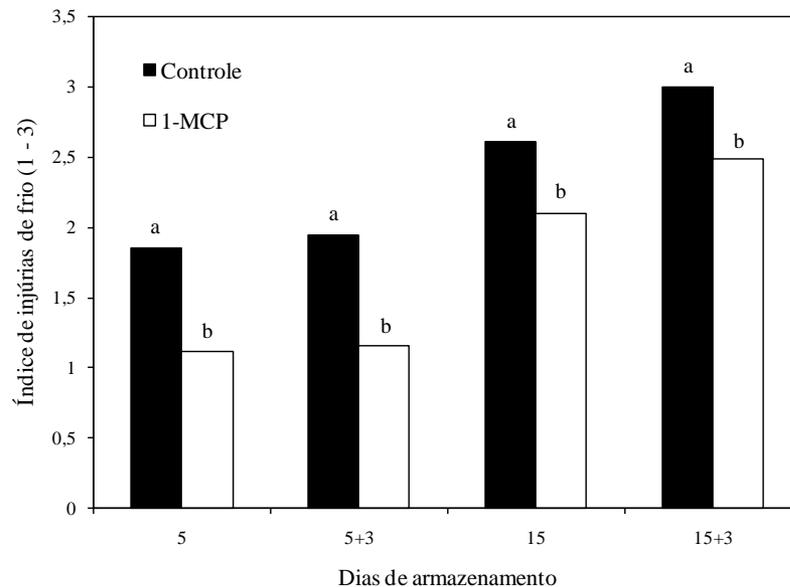


Figura 1 - Índice de injúrias de frio em bananas ‘Nanicão’ aos 5 e 15 dias a 6°C e após a exposição dos frutos a 20°C por 3 dias. Tratamentos seguidos pela mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$). Índice de injúrias de frio: 0 = sem dano; 1 = <25%; 2 = 25-50%; e 3 = >50% da superfície da casca afetada

Normalmente, alterações no padrão respiratório e de síntese de etileno são respostas que antecedem a exteriorização dos sintomas de *chilling* nos frutos e refletem alterações metabólicas e estruturais, geralmente irreversíveis, desencadeadas pela ação direta do frio aos constituintes celulares (WANG, 1982; KISLYUK; MIROSLAVOV; PALEEVA, 1995).

Neste estudo, não foram verificadas diferenças na atividade respiratória dos frutos controle e dos tratados com 1-MCP durante a refrigeração ou no período a 20°C. Todavia, foi observado que a atividade respiratória exibida pelos frutos aos 5 dias praticamente dobrou ao final do armazenamento a 6°C e também durante o período a 20°C (Figuras 2A e 2B). Por outro lado, o reaquecimento dos frutos por 3 dias após a remoção da refrigeração intensificou em até 6 vezes a atividade respiratória dos frutos controle e dos tratados com 1-MCP, em relação aos correspondentes valores observados nos períodos a 6°C. Segundo Semikhatova (1995), a intensificação da respiração frequentemente está associada a uma maior demanda energética celular, a qual pode estar relacionada a mudanças na estrutura e função do aparato mitocondrial em resposta ao estresse por baixa temperatura, sobretudo após o reaquecimento dos frutos (KISLYUK; MIROSLAVOV; PALEEVA, 1995; ZYKOVA; KOLESNICHENKO; VOINIKOV, 2002).

O padrão de evolução da síntese de etileno apresentado pelos frutos durante a refrigeração foi distinto do descrito anteriormente para a atividade respiratória. Nos frutos tratados com 1-MCP a síntese de etileno manteve-se baixa, inferior a $0,03\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ durante todo o período em que os frutos estiveram sob refrigeração, enquanto nos frutos controle a taxa de produção aos 10 e 15 dias a 6°C foi, em média, respectivamente, 6,2 e 4,6 vezes superior a exibida pelos frutos tratados com 1-MCP (Figuras 3A e 3B). A exposição dos frutos à temperatura ambiente, após a remoção da refrigeração intensificou a síntese de etileno de ambos os frutos, todavia a produção de etileno exibida pelos frutos controle foi significativamente maior que a dos frutos tratados com 1-MCP em todos os períodos. Apartir desses padrões na síntese de etileno exibidos pelos frutos durante a refrigeração e também no período a 20°C, foi possível observar que a maior incidência de *chilling* esteve associada a acréscimos na síntese de etileno. Dessa forma, a supressão da evolução da síntese de etileno nos frutos intactos mediante a aplicação do 1-MCP foi responsável pela redução da sensibilidade das bananas às injúrias de frio (Figuras 1, 3A e 3B). Ben-Amor et al. (1999) demonstraram que a supressão da produção autocatalítica de etileno em melões cantalupe transformados, reduziu consideravelmente a sensibilidade dos frutos às injúrias de frio.

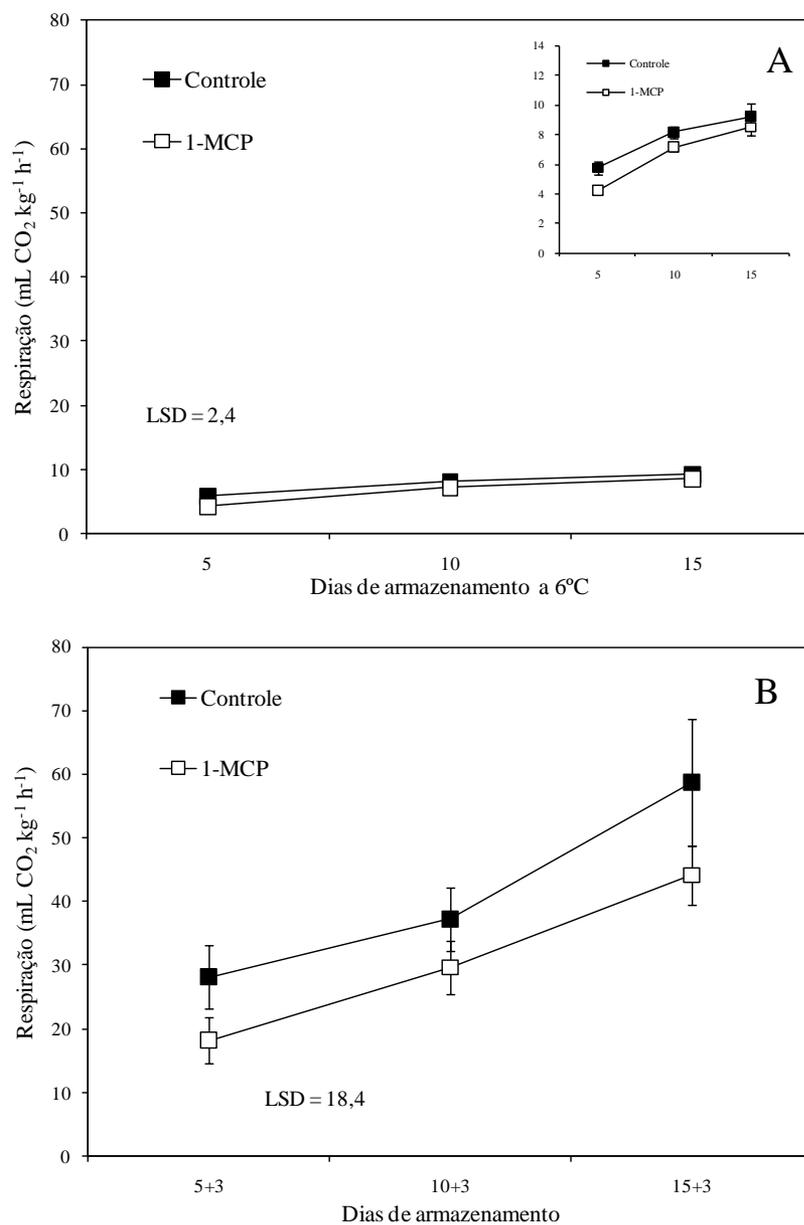


Figura 2 - Atividade respiratória de bananas 'Nanicão' durante o armazenamento a 6°C (A) e após a remoção dos frutos da refrigeração aos 5, 10 e 15 dias seguida de 3 dias a 20°C (B). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD (p<0,05)

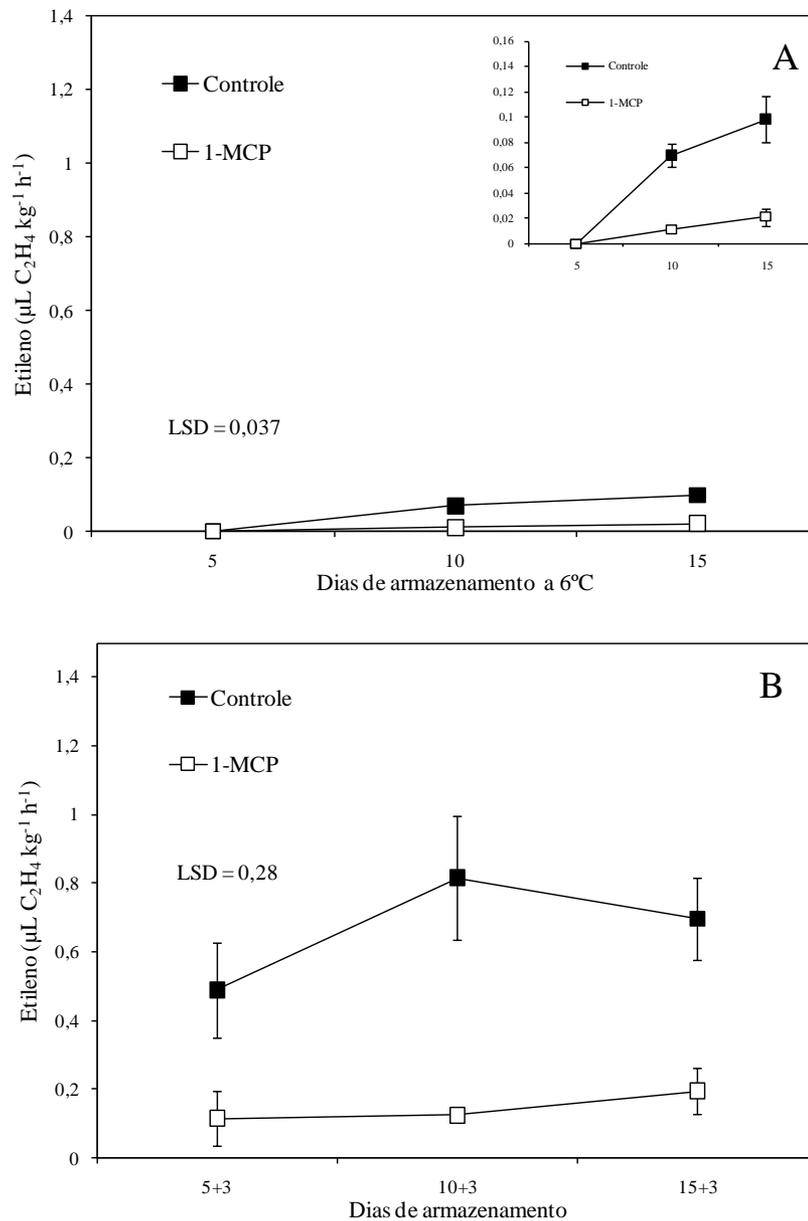


Figura 3 - Síntese de etileno de bananas ‘Nanicão’ durante o armazenamento a 6°C (A) e após a remoção dos frutos da refrigeração aos 5, 10 e 15 dias seguida de 3 dias a 20°C (B). Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD ($p < 0,05$)

De modo a buscar um melhor entendimento da possível relação entre o etileno e a sensibilidade das bananas às injúrias de frio, foram avaliados, na casca dos frutos, parâmetros relacionados à síntese e ao metabolismo do etileno após a remoção dos frutos da refrigeração e posterior exposição à temperatura ambiente.

A capacidade de conversão do ACC exógeno em etileno pelos discos de casca das bananas tratadas com 1-MCP foi significativamente superior à apresentada pelo controle aos 5, 10 e 15 dias (Figura 4A). Ao final do armazenamento, a atividade *in vivo* da ACO diminuiu em ambos os tratamentos em relação aos 10+3 dias, porém essa redução foi mais pronunciada na casca dos frutos controle, possivelmente devido à intensificação das injúrias de frio. Considerando que a ACO é dependente da integridade das membranas, é possível que a maior incidência de injúrias de frio na casca do controle possa ter sido a causa da menor capacidade de conversão do ACC em etileno (ANDERSEN et al., 1986; RAMASSAMY et al., 1998; ANTUNES; SFAKIOTAKIS, 2002). Em geral, a atividade *in vivo* não apresentou uma clara relação com a atividade *in vitro* da ACO nem com a síntese de etileno exibida pelos frutos intactos (Figuras 3 e 4).

Após a colheita dos frutos, apenas traços de etileno foram detectados a 20°C, indicativo de que as bananas estavam no estágio pré-climatérico. Ainda, nesses frutos, a atividade *in vitro* da ACO não foi detectada e o conteúdo de ACC livre na casca foi aproximadamente 7 vezes inferior ao conteúdo malonilado (MACC), o que pode explicar, em parte, a baixa síntese de etileno observada tanto antes da aplicação dos tratamentos quanto nos primeiros cinco dias sob refrigeração (Figuras 4B, 5A e 5B).

Após cinco dias de exposição dos frutos a 6°C, seguido do reaquecimento durante 3 dias a 20°C, verificou-se um abrupto acréscimo na atividade *in vitro* da ACO presente na casca dos frutos controle. Em contraste, no mesmo período a atividade da ACO permaneceu extremamente baixa na casca dos frutos tratados com 1-MCP. Nos frutos controle, a elevação inicial na atividade *in vitro* da enzima formadora do etileno e sua manutenção aos 10+3 dias, são coerentes com o padrão de síntese observado pelos frutos intactos após a remoção da refrigeração. A mesma observação também pode ser estendida para os frutos tratados com 1-MCP (Figuras 3B e 4B). O subsequente declínio na atividade *in vitro* da ACO, observado ao final do armazenamento, especialmente no controle, possivelmente esteja ligado ao efeito direto da baixa temperatura na atividade da oxidase, considerando que o conteúdo de ACC livre era cerca de duas vezes maior que o observado na casca das bananas tratada com 1-MCP (WANG, 1995).

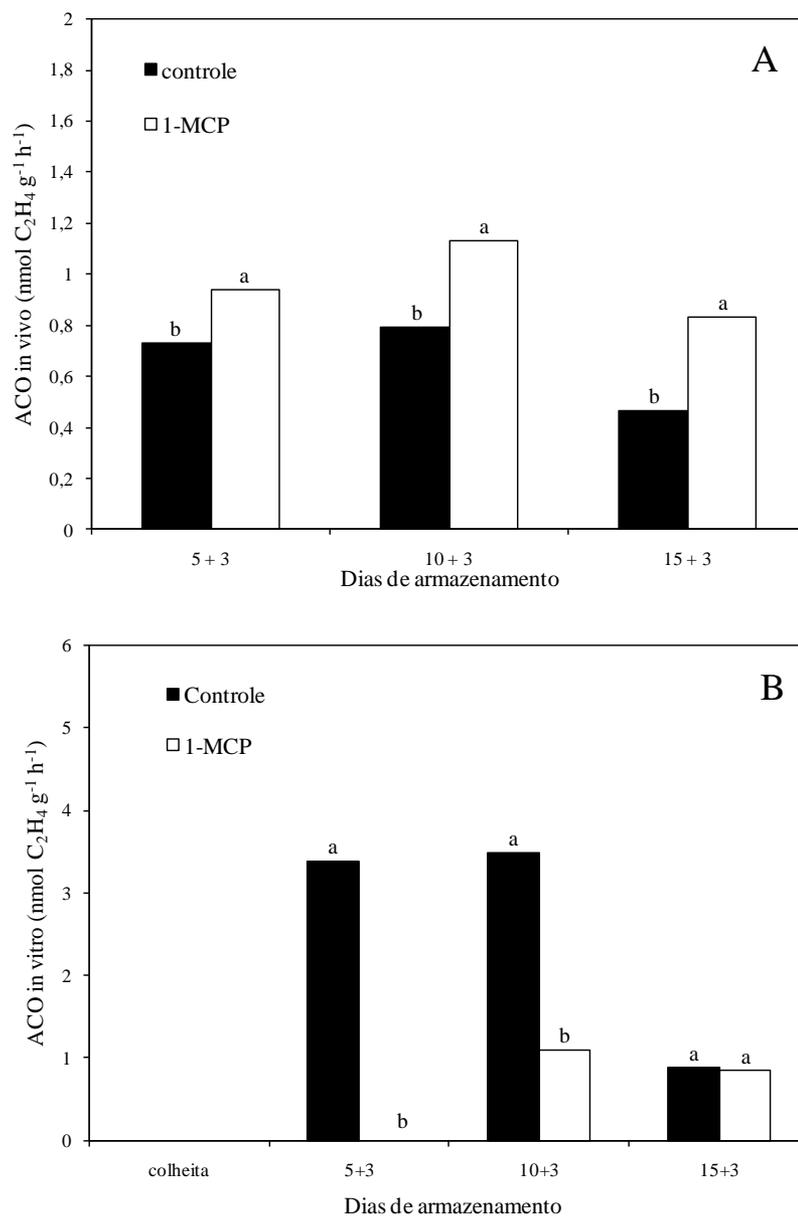


Figura 4 - Atividade *in vivo* (A) e *in vitro* (B) da ACO na casca de bananas 'Nanicão' após 5, 10 e 15 dias a 6°C seguida de 3 dias a 20°C. Tratamentos seguidos pela mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$)

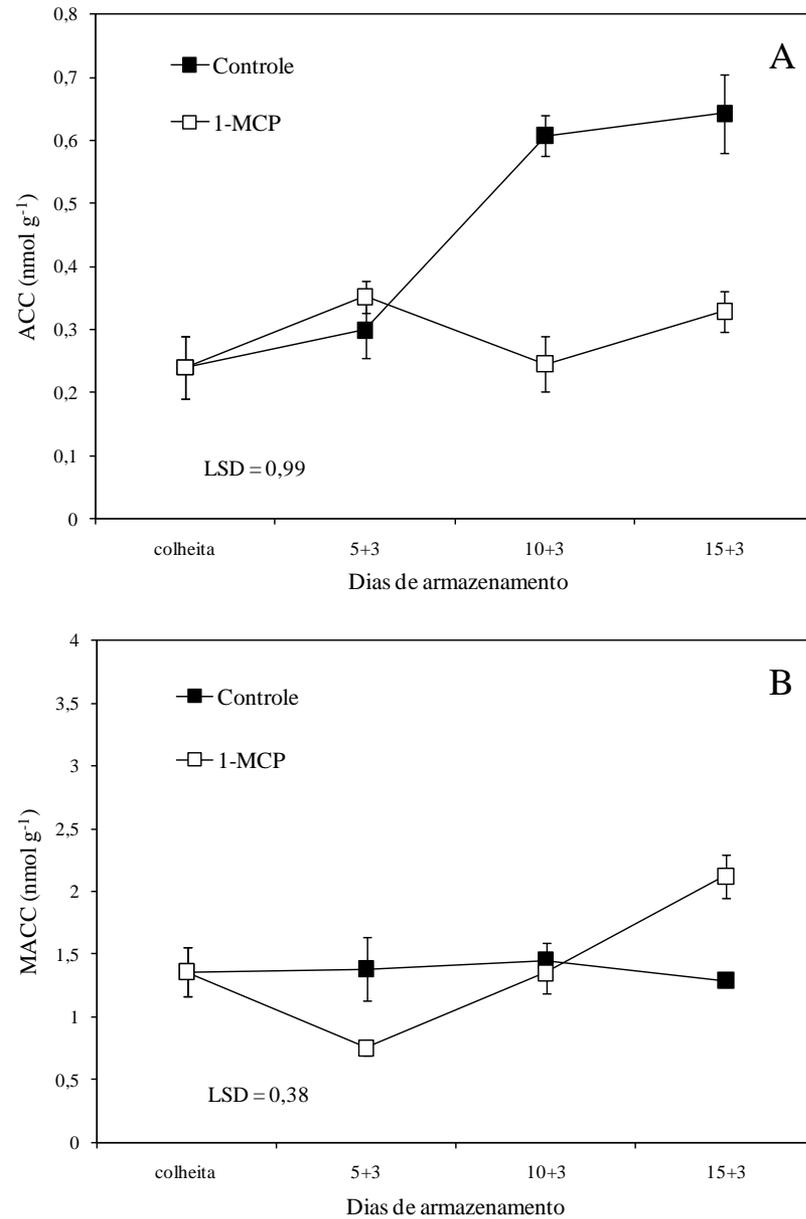


Figura 5 - Conteúdo de ACC livre (A) e malonilado (B) na casca de bananas ‘Nanicão’ na colheita e após 5, 10 e 15 dias a 1°C seguido de 3 dias a 20°C. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD (p<0,05)

Com relação à estimativa da permeabilidade das membranas, verificou-se que os discos de casca das bananas tratadas com 1-MCP apresentaram os menores percentuais de vazamento de íons durante o armazenamento quando comparados aos do controle, indicando, dessa forma, que o etileno está envolvido com o processo de desestabilização das membranas induzido pela baixa temperatura (Figura 6A). Em estudo realizado com melões cantalupe transformados, Ben-Amor et al. (1999) verificaram que a supressão da produção autocatalítica do etileno resultou em menor degradação das membranas da casca quando comparada à dos frutos controle após 16 dias a 2°C (+5 dias a 22°C). Além disso, também foi verificado que o tratamento dos melões transformados por mais de um dia com 10µL L⁻¹ de etileno antes da exposição a 2°C, promoveu significativo acréscimo no vazamento de íons da casca. Em contraste, quando o mesmo tratamento com etileno foi realizado após a remoção dos frutos da refrigeração, o vazamento de íons da casca permaneceu inalterado em relação ao dos frutos não tratados, indicando que o estímulo à degradação das membranas requer a ação conjunta do etileno com a baixa temperatura.

Na casca das bananas, as alterações na estabilidade das membranas, demonstradas por meio do vazamento de íons, foram confirmadas por meio do diferencial acúmulo de TBARS observado ao longo do armazenamento em ambos os tratamentos (Figuras 6A e 6B). O acréscimo no conteúdo de TBARS, observado aos 5+3 dias na casca dos frutos controle e sua manutenção até o final do armazenamento em nível significativamente superior ao observado na casca dos frutos tratados com 1-MCP, indicam que o bloqueio da ação do etileno promove maior manutenção das membranas por reduzir a geração de radicais livres (Figura 7) e também, possivelmente por inibir a atividade de enzimas ligadas à sua degradação, como a lipoxigenase.

Desta forma, considerando-se que a manutenção da integridade das membranas celulares é crucial dentro de vários aspectos do metabolismo celular, e também de modo a evitar uma série de reações em cascata que desencadearão o surgimento das injúrias de frio em frutos, pode-se inferir que a adoção de tratamentos que evitam ou reduzem a perda da estabilidade das membranas, propiciam maior tolerância dos frutos às injúrias de frio.

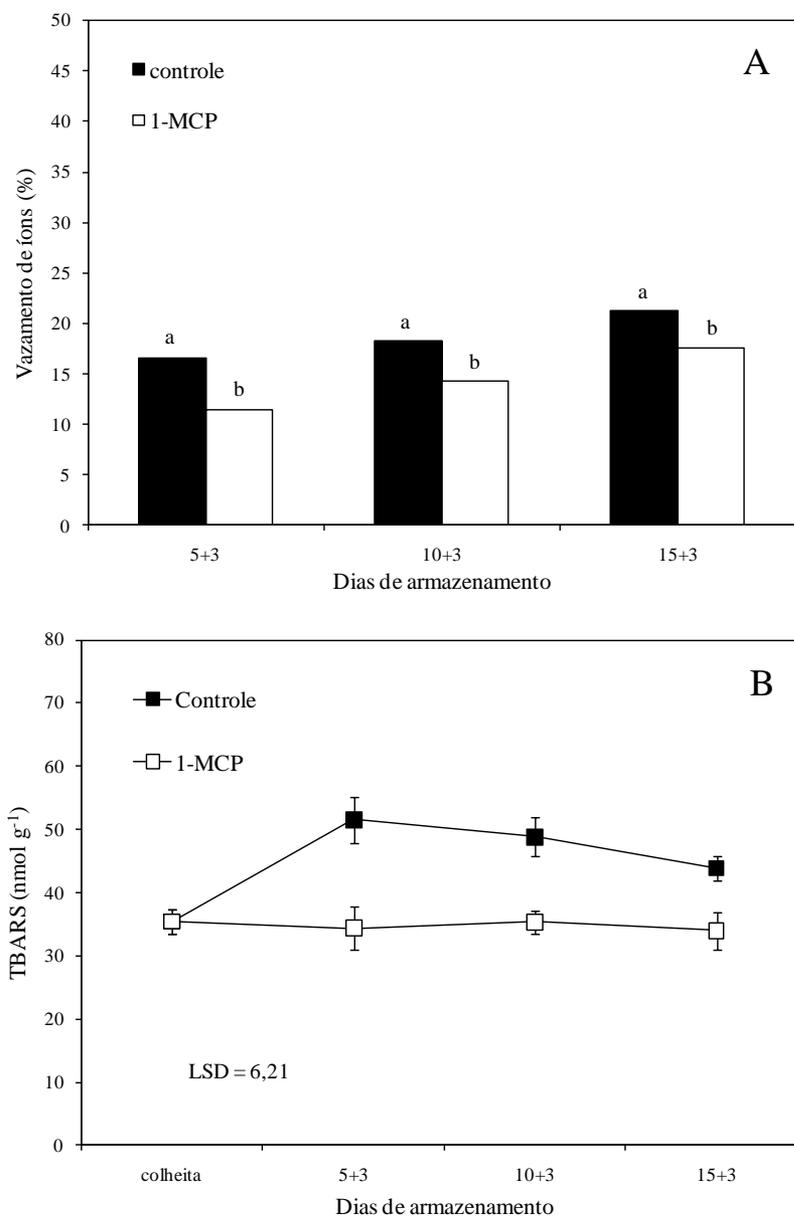


Figura 6 - Vazamento de íons (A) e conteúdo de TBARS (B) na casca de bananas ‘Nanicão’ após 5, 10 e 15 dias a 6°C seguido de 3 dias a 20°C. Em (A) tratamentos seguidos pela mesma letra, em cada período, não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$). Em (B) as barras verticais indicam o erro padrão ($n=4$). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD ($p < 0,05$)

Em vários estudos foi sugerido que o evento inicial que desencadeia o desenvolvimento do *chilling* em tecido vegetais ocorre em nível de membrana, sendo decorrente da ação de radicais livres (MARANGONI; PALMA; STANLEY, 1996; SALA, 1998; HODGES et al., 1999). No presente estudo, foi observado que em resposta ao estresse desencadeado pela baixa temperatura, houve significativo acréscimo na produção de radicais livres na casca da banana. Em relação à colheita, houve elevação de até 4 vezes na geração de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio na casca dos frutos após 5 dias a 6°C, mais 3 dias à temperatura ambiente. No entanto, neste mesmo período, não houve diferença no conteúdo acumulado de O_2^- e H_2O_2 na casca dos frutos tratados com 1-MCP em relação ao controle (Figuras 7 e 9).

Nas avaliações subsequentes, foi observado que o bloqueio da ação do etileno inibiu a elevação da geração de radicais superóxido na casca das bananas, pois o conteúdo acumulado deste radical livre manteve-se estável ao longo do armazenamento. Contrariamente, na casca do controle, o conteúdo de superóxido aumentou e, ao final do armazenamento, foi em média 26,4% superior ao observado na casca dos frutos tratados com 1-MCP.

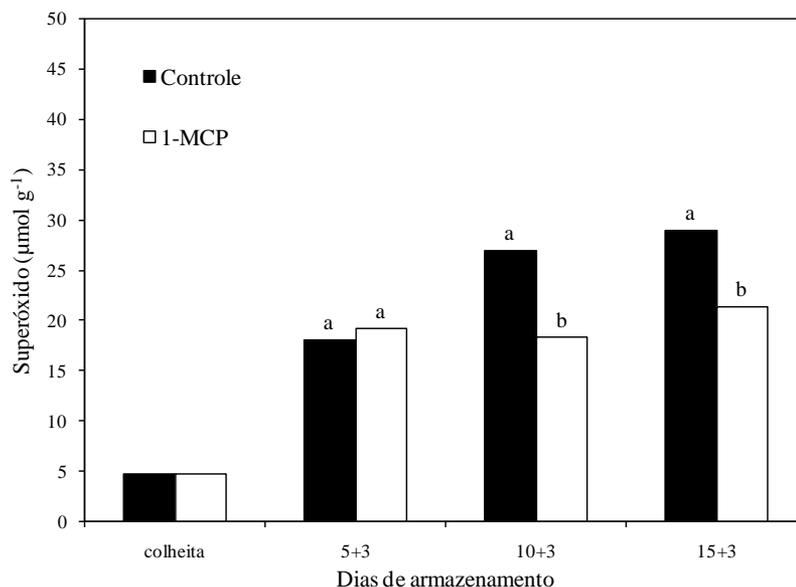


Figura 7 - Conteúdo de radicais superóxido na casca de bananas 'Nanicão' na colheita e após 5, 10 e 15 dias a 6°C seguido de 3 dias a 20°C. Tratamentos seguidos pela mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$)

A atividade da SOD presente na casca das bananas foi determinada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante, a qual revelou a existência de três isoformas ativas, representadas pelas bandas I, II e III (Figura 8). Considerando que a intensidade das bandas está relacionada à atividade das isoformas da enzima, as quais compõem a atividade total da SOD, pode-se afirmar que durante o período avaliado não houve diferença na atividade total da SOD presente na casca do controle ou dos frutos tratados com 1-MCP. Além disso, pode-se afirmar que a isoforma II contribuiu em maior extensão para a atividade total da SOD na casca das bananas durante o armazenamento a 6°C e subsequente reaquecimento a 20°C. Apesar de não ter havido significativa intensificação na atividade da SOD, verificou-se sua manutenção ao longo do armazenamento, indicando que os radicais estavam sendo removidos do tecido (WANG, 1995; RIVERA et al., 2004).

A superóxido dismutase desempenha papel central no metabolismo das EROs em plantas, pois além de neutralizar a reatividade do radical superóxido (BOWLER et al. 1992) evita a formação de radicais potencialmente mais tóxicos, como o radical hidroxila (OH^\cdot) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000), impedindo assim, uma série de reações em cascata que intensificariam o estresse oxidativo no tecido. A ação da SOD, em conjunto com outras enzimas, como a CAT e APX converte o O_2^\cdot e o H_2O_2 , potencialmente tóxicos, a oxigênio molecular e água, evitando maiores danos às células vegetais (SCANDALIOS, 1993; MITTLER, 2002). De tal modo, a atividade conjunta da SOD, CAT, APX e GR é essencial para a manutenção do equilíbrio entre a geração e a remoção das EROs (FOYER et al., 1994).

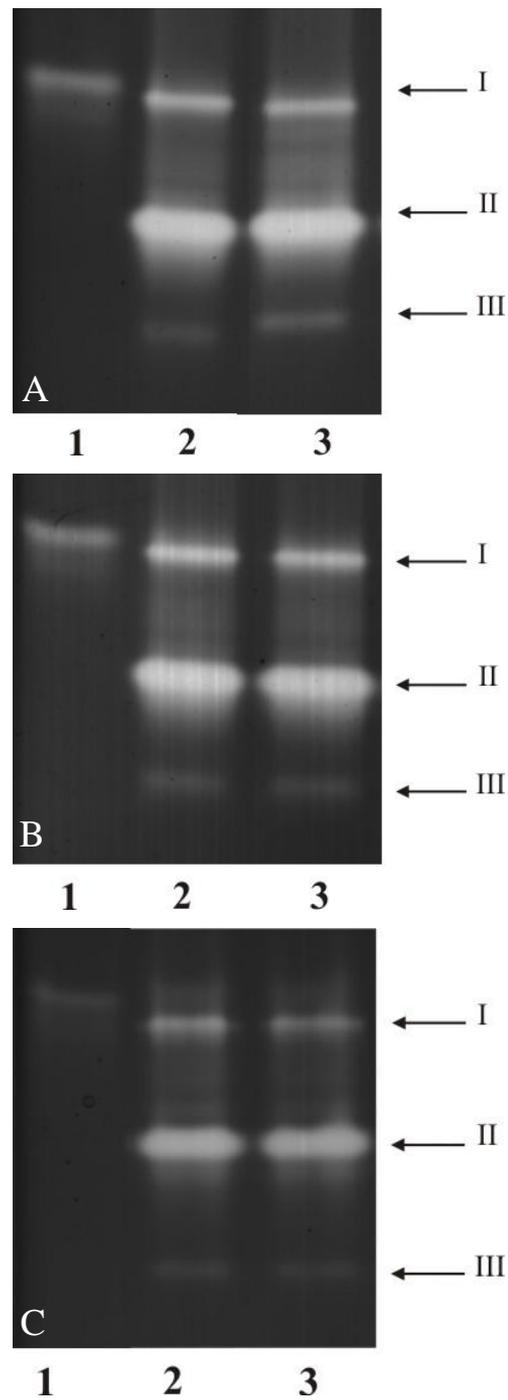


Figura 8 - Atividade da superóxido dismutase em gel de poliacrilamida não desnaturante aos 5 (A), 10 (B) e 15 (C) dias a 6°C (+3 dias a 20°C). (1) padrão de SOD bovina, (2) controle, (3) 1000nL L⁻¹ 1-MCP. As setas laterais representam as isoformas de SOD presentes na casca da banana

À semelhança do padrão verificado com os radicais superóxido, o conteúdo de peróxido de hidrogênio na casca de ambos os frutos também aumentou de modo consistente nos primeiros dias de armazenamento (5+3 dias) se comparado ao conteúdo observado na colheita (Figura 9). Esta elevação pode ser indicativa de que os radicais superóxido, gerados em resposta ao estresse desencadeado pelo frio, estavam sendo eficientemente dismutados pelas três isoformas ativas da SOD, presentes na casca da banana.

Durante o armazenamento, o conteúdo de peróxido de hidrogênio na casca dos frutos tratados com 1-MCP manteve-se sempre levemente inferior ao observado na casca do controle, porém apenas aos 15+3 dias essa diferença foi estatisticamente significativa.

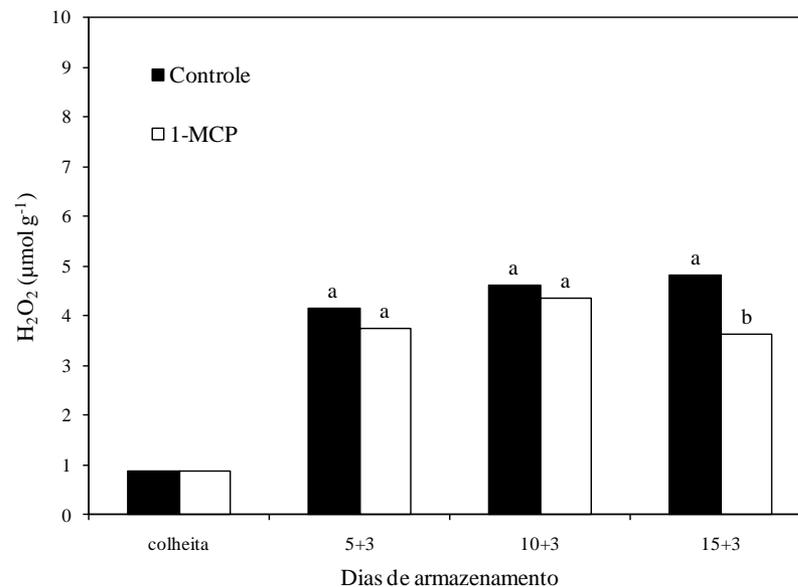


Figura 9 - Conteúdo de peróxido de hidrogênio na casca de bananas ‘Nanicão’ na colheita e após 5, 10 e 15 dias a 6°C seguido de 3 dias a 20°C. Tratamentos seguidos pela mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$)

Considerando os potenciais efeitos nocivos das EROs quando produzidas em excesso, é possível afirmar que a menor geração de radicais livres na casca das bananas tratadas com 1-MCP contribuiu para a manutenção da integridade das membranas celulares da casca destes frutos (Figuras 6, 7 e 9), pois ao evitar a intensificação do estresse oxidativo, conseqüentemente, reduzem-se processos degradativos, como a peroxidação lipídica (HARIYADI; PARKIN, 1991; WANG, 1995; HODGES et al., 2004). Portanto, é essencial que o sistema antioxidante seja eficiente e atue

de forma coordenada de modo a manter a concentração dos radicais superóxido e peróxido de hidrogênio em níveis baixos no tecido vegetal (KANG et al., 2003).

Apartir dos 5+3 dias de armazenamento observou-se significativo decréscimo na atividade da CAT, APX e GR na casca dos frutos controle. Este decréscimo na capacidade de remoção das espécies reativas de oxigênio foi acompanhado por elevação no conteúdo de radicais livres na casca, que resultou em significativa degradação das membranas e foi traduzida em acréscimos no índice de escurecimento da casca dos respectivos frutos ao longo do armazenamento (Figuras 1, 9, 10 e 11). Por outro lado, na casca dos frutos tratados com 1-MCP, a atividade específica da CAT apresentou significativa elevação aos 10+3 dias, e permaneceu 2,8 vezes superior à atividade observada na casca do controle ao final do armazenamento (Figura 10). Adicionalmente, a inibição da ação do etileno na casca da banana também evitou a redução e manteve a atividade da APX e GR superior a dos frutos controle após 15 dias a 6°C mais 3 dias a 20°C (Figuras 11 e 12). Estes resultados indicam que a ação conjunta da CAT e APX foi responsável pelo menor acúmulo de H₂O₂ na casca dos frutos tratados com 1-MCP.

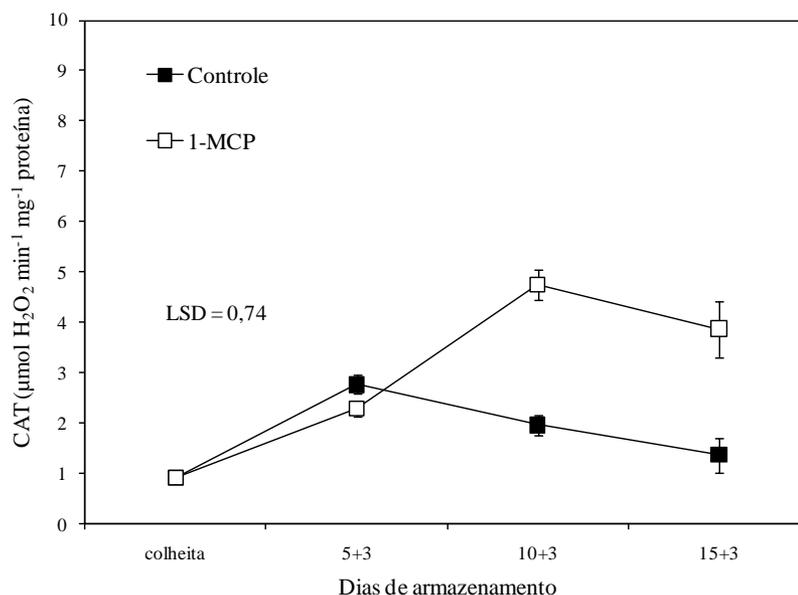


Figura 10 - Atividade específica da CAT na casca de bananas 'Nanicão' na colheita e após 5, 10 e 15 dias a 6°C seguida de 3 dias a 20°C. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD (p<0,05)

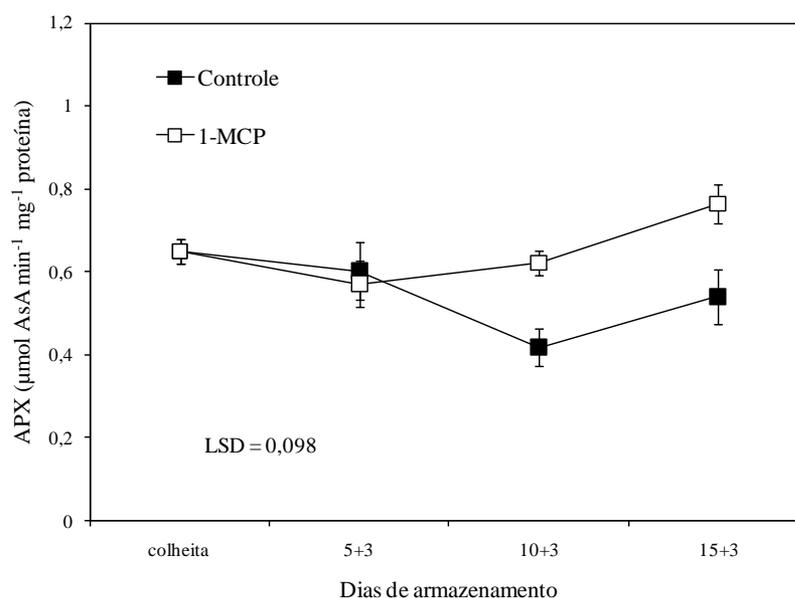


Figura 11 - Atividade específica da APX na casca de bananas ‘Nanicão’ na colheita e após 5, 10 e 15 dias a 6°C seguida de 3 dias a 20°C. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD (p<0,05)

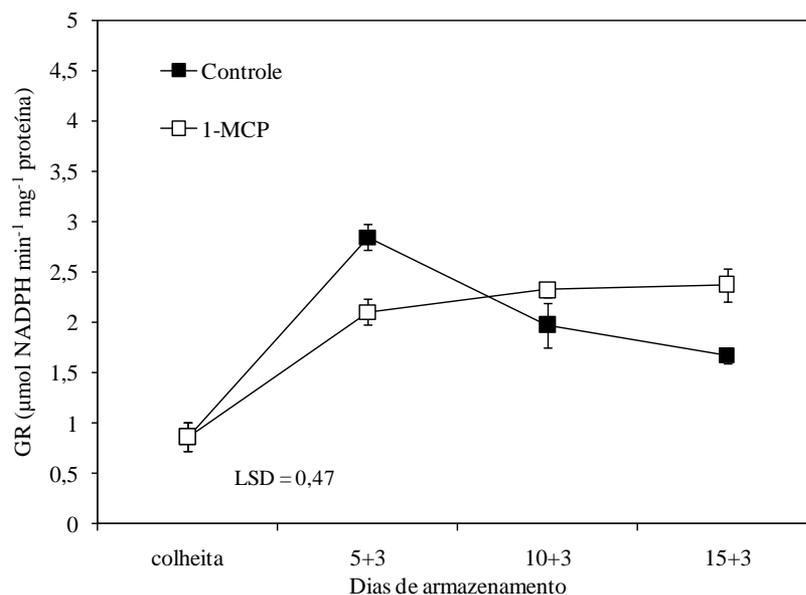


Figura 12 - Atividade específica da GR na casca de bananas ‘Nanicão’ na colheita e após 5, 10 e 15 dias a 6°C seguida de 3 dias a 20°C. Barras verticais indicam o erro padrão (n=4). Diferença mínima significativa entre tratamentos é dada segundo o teste LSD (p<0,05)

De modo geral, os resultados obtidos no presente trabalho estão em conformidade com outros estudos realizados anteriormente, os quais também observaram indícios de que o desenvolvimento dos sintomas de *chilling* em frutos é decorrente da intensificação do estresse oxidativo nos tecidos vegetais (HARIYADI; PARKIN, 1991; SALA, 1998; ZHENG et al., 2008; CAO et al., 2009). Além disso, também foi verificado, à semelhança do estudo realizado por Ben-Amor et al. (1999), que a inibição da percepção do etileno aumenta a tolerância de bananas ao frio por evitar a inicialização de eventos ligados à degradação das membranas celulares, que culminam com a exteriorização visual das injúrias de frio na casca dos frutos.

2.5.4 Conclusões

O bloqueio da ação do etileno confere à banana maior tolerância às injúrias de frio devido à maior capacidade de remoção de espécies reativas de oxigênio e à manutenção da integridade das membranas da casca.

A associação entre o etileno e a baixa temperatura na casca da banana favorece o estresse oxidativo por reduzir a capacidade de remoção de espécies reativas de oxigênio e induzir a degradação das membranas da casca.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A temperatura e o tempo de exposição a que os frutos foram submetidos foi determinante no tipo de resposta desencadeada após a exposição à situação de estresse, representada pela baixa temperatura. A aplicação dos tratamentos térmicos de curta duração com altas temperaturas demonstrou ser efetivo na indução de tolerância ao frio. Por outro lado, o condicionamento dos frutos à temperatura de 37°C por 10 horas teve efeito contrário. Neste caso, a ineficácia do condicionamento térmico foi associada à intensificação da geração de espécies reativas de oxigênio além da capacidade de remoção do tecido, o que favoreceu a antecipação do desenvolvimento das injúrias de frio na casca da banana.

O conjunto de respostas desencadeadas pelo metil jasmonato e/ou metil salicilato, que resultaram em redução da sensibilidade da lima ácida às injúrias de frio, esteve relacionada à maior capacidade de remoção das espécies reativas de oxigênio, a qual foi favorecida pela elevação da atividade da SOD, CAT, APX e GR ao longo do armazenamento.

A inibição da percepção do etileno e a supressão da evolução da síntese durante o armazenamento da banana foram responsáveis pela redução da sensibilidade da casca às injúrias de frio. Esta observação foi corroborada na lima ácida, onde o bloqueio da ação do etileno não suprimiu a evolução da síntese, resultando em reduzida capacidade de remoção do peróxido de hidrogênio do flavedo. Estes resultados sugerem que a associação da baixa temperatura com o etileno favorece o estresse oxidativo, por reduzir a capacidade celular de combater eficientemente os radicais superóxido e o peróxido de hidrogênio gerado em resposta ao frio. Devido à perda da homeostase celular, eventos ligados à degradação das membranas celulares são intensificados e culminam com a morte celular e exteriorização visual das injúrias.

Concluindo, é possível afirmar que a efetividade dos tratamentos térmicos e químicos em induzir à banana e à lima ácida maior tolerância ao frio está associada a três aspectos fundamentais. 1) supressão ou bloqueio de parte das cascatas de transdução de sinal desencadeadas pela ação do etileno; 2) manutenção da integridade e permeabilidade das membranas celulares; 3) elevação e manutenção da atividade das enzimas responsáveis pela remoção de espécies reativas de oxigênio a níveis compatíveis com a intensidade do estresse enfrentado pelo fruto. É provável que a interação destes fatores com a baixa temperatura seja determinante na modulação da resposta requerida para promover maior ou menor tolerância de frutos à baixa temperatura.

REFERÊNCIAS

- ALSCHER, R.G.; AMTHOR, J.S. The physiology of free-radical scavenging: Maintenance and repair processes. In: SCHULTE-HOSTEDE, S.; DARALL, N.M.; BLANK, L.W.; WELLBBURN, A.R. (Ed.). **Air pollution and plant metabolism**. London: Elsevier Applied Science, 1988. p.94-115.
- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, p.1331-1341, 2002.
- ANDERSEN, C.R. Rapid synthesis of ACC and ethylene by chilling-stressed cucumber fruit. **HortScience**, Alexandria, v.21 p.858, 1986.
- ANDERSEN, C.R.; KENT, M.W. Storage of cucumber fruit at chilling temperatures. **HortScience**, Alexandria, v.17, p.527, 1982.
- ANTUNES, M.D.C.; PATERAKI, I.; KANELIS, A.K.; SFAKIOTAKIS, E.M. Differential effects of low temperature inhibition on the propylene induced autocatalysis of ethylene production, respiration and ripening of Hayward kiwifruit. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v.92, p.29 -39, 2002.
- ANTUNES, M.D.C.; SFAKIOTAKIS, E.M. Chilling induced ethylene biosynthesis in Hayward kiwifruit following storage. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.92, p.29 -39, 2002.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v.50, p.601-639, 1999.
- ASADA, K.; TAKAHASHI, M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: KYLE, D.J.; OSMOND, C.B.; ARNTZEN, C.J. (Ed.). **Photoinhibition**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p.227-287.
- ATTA ALY, M.A. Effects of high temperature on ethylene biosynthesis by tomato fruits. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.2, p.19-24, 1992.
- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.104, p.280-292, 1998.

- BALANDRÁN-QUINTANA, R.R.; MENDOZA-WILSON, A.M.; GARDEA-BÉJAR, A.A.; VARGAS-ARISPURO, I.; MARTÍNEZ-TELLEZ, M.A. Irreversibility of chilling injury in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.) could be a programmed event long before the visible symptoms are evident. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, Orlando, v.307, p.553-557, 2003.
- BARROS, S.A. RODRIGUES, J.D.; RODRIGUES, S.D.; PEDRAS, J.F. Efeito do ácido giberélico e do uniconazole na fisiologia pós-colheita do limão 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Tanaka). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.13, p.223-226, 1991.
- BEN-AMOR, M.; FLORES, B.; LATCHÉ, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J.C.; ROMOJARO, F. Inhibition of ethylene biosynthesis by antisense ACC oxidase RNA prevents chilling injury in Charentais cantaloupe melons. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.22, p.1579-1586, 1999.
- BERGER, S.; WEICHERT, H.A.; PORZEL, C.; WASTERNAK, H.K.; FEUSSNER, I. Enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation in leaf development. **Biochemical et Biophysical Acta**, Amsterdam, v.1533, p.266-276, 2001.
- BIGGS, M.S.; WOODSON, W.R.; HANDA, A.K. Biochemical basis of high temperature inhibition of ethylene biosynthesis in ripening tomato fruit. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.72, p.572-578, 1988.
- BOWLER, C.; VAN CAMP, W.; VAN MONTAGÚ, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v.13, p.199-218, 1994.
- BOWLER, C.; VAN MONTAGÚ, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v.43, p.83-116, 1992.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, p.248-254, 1976.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, San Diego, v.52, p. 302-310, 1978.
- CAO, S.; ZHENG, Y.; WANG, K.; JIN, P.; RUI, H. Methyl jasmonate reduces chilling injury and enhances antioxidant enzyme activity in postharvest loquat fruit. **Plant Science**, Kidlington, v.115, p.1458-1463, 2009.
- CHAI PRASART, P.; GEMMA, H.; IWAHORI, S. Reduction of chilling injury in stored banana fruit by jasmonic acid derivative and abscisic acid treatment. **Acta Horticulturae**, Leuven, n.575, p.689-696, 2002.
- CHAN, H.T. Effects of heat treatments on the ethylene forming enzyme system in papaya. **Journal of Food Science**, Chicago, v.51, p.581 – 583, 1986.

CHAN, H.T. Ripeness and tissue depth effects on heat inactivation of papaya ethylene forming enzyme. **Journal of Food Science**, Chicago, v.56, p.996 – 998, 1991.

CHAPLIN, G.R.; WILLS, R.B.; GRAHAM, D. Induction of chilling injury in stored avocados with exogenous ethylene. **HortScience**, Alexandria, v.18, p.952–953, 1983.

CHEN, J-Y, HE, L.H.; JIANG, Y.M.; WANG, Y.; JOICE, D.C.; JI, Z.L.; LU, W.J. Role of phenylalanine ammonia-lyase in heat pretreatment-induced chilling tolerance in banana fruit. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.132, p.318-328, 2008.

CHEN, Z.; SILVA, H.; KLESSIG, D.F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. **Science**, Washington, v.262, p.1883-1886, 1993.

CONCELLÓN, A.; AÑÓN, M.C.; CHAVES, A.R. Effect of chilling injury on ethylene production in eggplant fruit. **Food Chemistry**, Oxford, v.92, p.63–69, 2005.

CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E. Biosynthesis and action of jasmonate in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.48, p.355-381, 1997.

CREENCIA, R.P.; BRAMLAGE, W.J. Reversibility of chilling of corn seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v.47, p.389-392, 1971.

CREISSEN, G.P.; EDWARDS, E.A.; MULLINEAUX, P.M. **Glutathione reductase and ascorbate peroxidase**. In: FOYER, C.H. MULLINEAUX P.M. (Ed.). Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.343–364.

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVÁ, E.; VAN MONTAGÚ, M.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Science**, Oklahoma, v.57, p.779-795, 2000.

DE SANTIS, A.; LANDI, P.; GENCHI, G. Changes of mitochondrial properties in maize seedlings associated with selection for germination at low temperature. Fatty acid composition, cytochrome c oxidase, and adenine nucleotide translocase activity. **Plant Physiology**, Rockville, v.119, p.743-754, 1999.

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

DHINDSA, R. S.; MATOWE, W. Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defense against lipid peroxidation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 32, p. 79-91, 1981.

DING, C.K.; WANG, C.Y.; GROSS, K.; SMITH, D.L. Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate. **Plant Science**, Kidlington, v.161, p.1153-1159, 2001.

DING, C.K.; WANG, C.Y. The dual effects of methyl salicylate on ripening and expression of ethylene biosynthetic genes in tomato fruit. **Plant Science**, Kidlington, v.164, p.589-596, 2003.

DOMÍNGUEZ, M.; VENDRELL, M. Ethylene biosynthesis in banana fruit: evolution of EFE activity and ACC levels in peel and pulp during ripening. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.68, p.63-70, 1993.

DUNLAP, J.R.; LINGLE, S.E.; LESTER, G.E. Ethylene production in netted muskmelon subjected to postharvest heating and refrigerated storage. **HortScience**, Alexandria, v.25, p.207-209, 1990.

DUPILLE, E.; ZACARIAS, L. Extraction and biochemical characterization of wound-induced ACC oxidase from Citrus peel. **Plant Science**, Kidlington, v.114, p.53-60, 1996.

ELSTNER, E.F. Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. In: PELL, E.J.; STEFFEN, K.L. (Ed.). **Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism, current topics in plant physiology**. Rockville, 1991, p.57-66.

ESTANISLAU, M.L.L.; BOTEON, M.; CANÇADO JÚNIOR, F.L.; PAIVA, B.M. Laranjas e sucos: aspectos econômicos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.22, p.8-20, 2001.

FALLIK, E. Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.32, p.125-134, 2004.

FAN, X.; MATTHEIS, J.P.; FELLMAN, J.K. responses of apples to postharvest jasmonate treatments. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.123 n.3, p.421-425. 1998.

FAO. Food Agriculture Organisation: crops & livestock primary & processed. Disponível em: <<http://fao.org>> Acesso em: 10 dez. 2007.

FAO. Food Agriculture Organisation: crops & livestock primary & processed. Disponível em: <<http://fao.org>> Acesso em: 22 mai. 2008.

FENG, L.; ZHENG, Y.H.; ZHANG, Y.F.; WANG, F.; ZHANG, L.; LU, Z.X. Methyl jasmonate reduces chilling injury and maintains postharvest quality of peaches. **Agricultural Science in China**, Hangzhou, v.2, n. 11, p.1246-1252, 2003.

FERGUSON, I.; VOLZ, R.; WOOLF, A. Preharvest factors affecting physiological disorders of fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.15, p.255-262, 1999.

FIELD, R.J. The role of low temperature on ethylene production by leaf tissue of *Phaseolus vulgaris*, L. **Annals of Botany**, Oxford, v.47, p.215-219, 1981.

- FILS-LYCAON, B.; MBÉGIÉ-A-MBÉGIÉ, D.; CHILLET, M.; JULIANUS, P.; GALAS, C.; GOMEZ, R.; HUBERT, O. Biochemical characterization of pulp of banana fruit: measurement of soluble sugars, organic acids, free ACC and in vitro ACC oxidase. **Fruits**, Paris, v.63, n.3, p.187-191, 2008.
- FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KENERT, K.J. Photooxidative stress in plants, **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.92, p.696-717, 1994.
- FOYER, C.H.; LOPEZ-DELGADO, H.; DAT, J.F.; SCOTT, I.M. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.100, p.241-254, 1997.
- FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, London, v.58, p.61-97, 1986.
- FUNG, R.W.; WANG, C.Y.; SMITH, D.L.; GROSS, K.C.; TIAN, M. MeSA and MeJA increase steady-state transcript levels of alternative oxidase and resistance against chilling injury in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). **Plant Science**, Kidlington, v.166, p.711-719, 2004.
- GAMBLE, P.E.; BURKE, J.J. Effect of water stress on the chloroplast antioxidant system. Alterations in glutathione reductase activity. **Plant Physiology**, Rockville, v.76, p.615-621, 1984.
- GAY, C.; COLLINS, J.; GEBICKI, J.M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylene orange complex. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 273, p.149-155, 1999.
- GHASEMNEZHAD, M.; MARSH, K.; SHILTON, R.; BABALAR, M.; WOOLF, A. Effect of hot water treatments on chilling injury and heat damage in 'Satsuma' mandarins: Antioxidant enzymes and vacuolar ATPase, and pyrophosphatase. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.48, p.364-371, 2008.
- GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A.; FORTIZ, J.; WANG, C.Y. Methyl jasmonate reduces chilling injury and maintains postharvest quality of mango fruit. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v.48, p.515-519, 2000.
- GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A.; BUTA, J.A.; WANG, C.Y. Methyl jasmonate and modified atmosphere packaging (MAP) reduce decay and maintain post-harvest quality of papaya "Sunrise". **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.28, p.361-370, 2003.
- GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v.32, p.481-494, 2005.
- GRIERSON, E.B.; GRIERSON, W.; SOULE, J. Chilling injury in tropical fruit. I. Bananas (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* cv. Lacatan). **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Washington, v.11, p.82-94, 1967.
- HALIM, V.A.; VESS, A.; SCHEEL, D.; ROSAHL, S. The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. **Plant Biology**, Stuttgart, v.8, p.307-313, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDG, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Oxford University Press, Oxford, 704p. 2000.

HARDENBURG, R.E.; WATADA, A.E.; WANG, C.Y. **The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks**. Washington: USDA, 1986. 130p. (USDA Agriculture Handbook, 66).

HARIYADI, P.; PARKIN, K.L. Chilling induced oxidative stress in cucumber fruits. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.1, p.33–35, 1991.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W.G.; STOREY, K.B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. **Free Radicals in Biology and Medicine**, San Diego, v.19, p.271–280, 1995.

HODGES, D.M. **Postharvest oxidative stress in horticultural crops**. New York: Food Product Press, 2003. 266p.

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

HODGES, D.M.; LESTER, G.E.; MUNRO, K.D.; TOIVONEN, P.M.A. Oxidative stress: importance for postharvest quality. **HortScience**, Alexandria, v.39, p.924-929, 2004.

HOFFMAN, N.E; LIU, Y.; YANG, S.F. Changes in 1-(malonylamino) cyclopropane- 1-carboxylic acid content in wilted wheat leaves in relation to their ethylene production rates and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content. **Planta**, Berlin, v.157, p.518-523, 1983.

HOFFMAN, N.E; YANG, S.F.; McKEON, T. Identification of 1-(malonylamino) cyclopropane-1-carboxylic acid as a major conjugate of 1-aminocyclopropane- 1-carboxylic acid, an ethylene precursor in higher plants. **Biochemistry and Biophysical Research Communication**, Orlando, v.104, p.765-770, 1982.

HORVÁTH, E.; SZALAI, G.; JANDA, T. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.26, p.290-300, 2007.

INABA, A.; LIU, X.; YOKOTANI, N.; YAMANE, M.; LU, W-J.; NAKANO, R.; KUBO, Y. Differential feedback regulation of ethylene biosynthesis in pulp and peel tissues of banana fruit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.58, p.1047-1057, 2007.

JANDA, T.; SZALAI, G.; TARI, I.; PÁLDI, E. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effect of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. **Planta**, Berlin, v.208, p.175-180, 1999.

- JANDA, T.; SZALAI, G.; ANTUNOVICS, Z.S.; HORVÁTH, E.; PÁLDI, E. Effect of benzoic acid and aspirin on chilling tolerance and photosynthesis in young maize plants. **Maydica**, Bergamo, v.5, p.29-33, 2000.
- JIANG, Y.; JOYCE, D.C.; JIANG, W.; LU, W. Effects of chilling temperatures on ethylene binding by banana fruit. **Plant Growth regulation**, New York, v.43, p.109-115, 2004.
- KADER, A.A.; ARPAIA, M.L. Postharvest handling systems: subtropical fruit. In: KADER, A.A. (Ed.). **Postharvest technology of horticultural crops**. Oakland, 2002. p.375-384.
- KANDEE, C.; KETSA, S.; VAN DOORN, W. Effect of heat treatment on ripening and early peel spotting in cv. Sucrier banana. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.52, p.288-293, 2009.
- KANG, G.; WANG, C.; SUN, G.; WANG, Z. Salicylic acid changes activities of H₂O₂-metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v.50, p.9-15, 2003.
- KANG, H.M.; SALTVEIT, M.E. Activity of enzymatic antioxidant defense systems in chilled and heat shocked cucumber seedling radicles. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 113, p. 548-556, 2001.
- KENT, M.W.; ANDERSEN, C.R.; PIKE, L.M. Chilling injury in cucumber fruit varieties. **HortScience**, Alexandria, v.23, p.727, 1988.
- KING, M.M.; LUNDFORD, P.M. Chilling injury and electrolyte leakage in fruit of different tomato cultivars. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.108, p.74-77, 1983.
- KISLYUK, I.M.; MIROSLAVOV, E.A.; PALEEVA, T.V. Stimulation of Respiration in Wheat Leaves and Proliferation of Mitochondria in Leaf Cells under Chilling. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v.42, p.603-606, 1995.
- KLEIN, J.D. Ethylene biosynthesis in heat treated apples. In: CLIJSTERS, H.; DE PROFT, M.; MARCELLE, R.; VAN POUICHE, M. (Ed.). **Biochemical and physiological aspects of ethylene production in lower and higher plants**. Dordrecht: Kluwer, 1989. p.184-190.
- KLUGE, R.A.; AZEVEDO, R.A.; JOMORI, M.L.L.; EDAGI, F.K.; JACOMINO, A.P.; GAZIOLA, S.A.; AGUILA, J.S. Efeitos de tratamentos térmicos aplicados sobre frutas cítricas armazenadas sob refrigeração. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, p.1388-1396, 2006.
- KOGEL, K.H.; LANGEN, G. Induced disease resistance and gene expression in cereals. **Cell Microbiology**, Oxford, v.7, p.1555-1564, 2005.
- KONDO, S.; KITTIKORN, M.; KANLAYANARAT, S. Preharvest antioxidant activities of tropical fruit and the effect of low temperature storage on antioxidants and jasmonates. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.36, p.309-318, 2005.

- KRATSCH, H.A.; WISE, R.R. The ultra structure of chilling stress. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.23, p.337-350, 2000.
- LACAN, D.; BACCOU, J.C. Changes in lipids and electrolyte leakage during nonnetted muskmelon ripening. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.121, p.554-558, 1996.
- LACAN, D.; BACCOU, J.C. High levels of antioxidant enzymes correlate with delayed senescence in nonnetted muskmelon fruits. **Planta**, Berlin, v.204, p.377-382, 1998.
- LAFUENTE, M.T.; ZACARIAS, L.; MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M.A.; SANCHEZ-BALLESTA, M.T.; DUPILLE, E. Phenylalanine ammonia-lyase as related to ethylene in the development of chilling symptoms during cold storage of citrus fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.49, p.6020-6025, 2001.
- LAFUENTE, M.T.; ZACARIAS, L.; MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M.A.; SANCHEZ-BALLESTA, M.T.; GRANELL, A. Phenylalanine ammonia-lyase and ethylene in relation to chilling injury as affected by fruit age in citrus. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.29, p.309-318, 2003.
- LAFUENTE, M.T.; SALA, J.M.; ZACARIAS, L. Active oxygen detoxifying enzymes and phenylalanine ammonia-lyase in the ethylene-induced chilling tolerance in citrus fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.52, p.3603-3611, 2004.
- LAFUENTE, M.T.; ZACARIAS, L. Postharvest disorders in citrus fruit. **Stewart Postharvest Review**, Quebec, v.1, p.1-9, 2006.
- LARSON, R.A. The antioxidants in higher plants. **Phytochemistry**, Oxford, v.27, p.969-978, 1988.
- LEDERMAN, I.E.; ZAUBERMAN, G.; WEKSLER, A.; ROT, I.; FUCKS, Y. Ethylene forming capacity during cold storage and chilling injury development in 'Keitt' mango fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.10, p.107-112, 1997.
- LEOPOLD, A.C.; MUSGRAVE, M.E. Respiratory changes with chilling injury of soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v.64, p.702-705, 1979.
- LESLIE, C.A.; ROMANI, R.G. Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid. **Plant Physiology**, Rockville, v.88, p.833-837, 1988.
- LEVINE, R.L.; MOSONI, B.S.; BERLET, B.S.; STADTMAN, E.R. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.93, p.15036-15040, 1996.

- LIPTON, W.J.; AHARONI, Y. Chilling injury and ripening of 'Honeydew' muskmelon stored at 2.5°C or 5°C after ethylene treatment at 20°C. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.104, p.327-330, 1979.
- LIU, X.; SHIOMI, S.; NAKATSUKA, A.; KUBO, Y.; NAKAMURA, R.; INABA, A. Characterization of ethylene biosynthesis associated with ripening in banana fruit. **Plant Physiology**, Rockville, v.121, p.1257-1265, 1999.
- LIZADA, M.C.C.; YANG, S.F. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.100 p.140-145, 1979.
- LUKATKIN, A.S. Contribution of oxidative stress to the development of cold-induced damage to leaves of chilling-sensitive plants: 2. The activity of antioxidant enzymes during plant chilling. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v.49, p.782-788, 2002.
- LURIE, S. Postharvest heat treatments. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.14, p.257-269, 1998.
- LURIE, S.; HANDROS, A.; FALLIK, E.; SHAPIRA, R. Reversible inhibition of tomato fruit gene expression at high temperature. **Plant Physiology**, Rockville, v.110, p.1207-1214, 1996.
- LURIE, S.; KLEIN, J.D. Heat treatment of ripening apples: differential effects on physiology and biochemistry. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.78, p.181-186, 1990.
- LURIE, S.; SABEHAT, A. Prestorage temperature manipulations to reduce chilling injury in tomatoes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.11, p.57-62, 1997.
- LYONS, J.M. Chilling injury in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, n.24, p. 445-466, 1973.
- MAALEKUU, K.; ELKIND, Y.; LEIKIN-FRENKEL, A.; LURIE, S., FALLIK, E. The relationship between water loss, lipid content, membrane integrity and LOX activity in ripe pepper fruit after storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.42, p.248-255, 2006.
- MARANGONI, A.G.; PALMA, T.; SANLEY, D.W. Membrane effects in postharvest physiology. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.7, p.193-17, 1996.
- MARTÍNEZ-ROMERO, D.; SERRANO, M.; VALERO, D. Physiological changes in pepino (*Solanum muricatum* Ait.) fruit stored at chilling and non-chilling temperatures. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.30 p.177-186, 2003.
- 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 of Plant Physiology**, Jena, v.150, p.674-678, 1997.

MAXWELL, D.P.; WANG, Y.; MACINTOSH, L. the alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.96, p.8271-8276, 1999.

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**, Amsterdam, v.6, p.55-64, 1995.

McCOLLUM, T.G.; McDONALD, R.E. Electrolyte leakage, respiration, and ethylene production as indices of chilling injury in grapefruit. **HortScience**, Alexandria, v.26, p.1191-1192, 1991.

McDONALD, R.E.; McCOLLUM, T.G.; BALDWIN, E.A. Temperature of water treatments influences tomato fruit quality following low temperature storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.16, p.147-155, 1999.

McMURDO, A.C.; WILSON, J.M. Chilling injury and Arrhenius plots. **Cryo Letters**, Lewes, v.1, p.231-238, 1980.

MEIR, S.; PHILOSOPH-HADAS, S.; LURIE, S.; DROBY, S.; AKERMAN, M.; ZAUBERMAN, G.; SHAPIRO, B.; COHEN, E.; FUCHS, Y. Reduction of chilling injury in stored avocado, grapefruit, and bell pepper by methyl jasmonate. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v.74, p.870-874, 1996.

MINIBAYEVA, F.; BECKETT, R.P. High rates of extracellular superoxide production in bryophytes and lichens, and an oxidative burst in response to rehydration following desiccation. **New Phytologist**, London, v.152, p.333-341, 2001.

MISRA, H.R.; FRIDOVICH, I. The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.247, p.188-192, 1972.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, London, v.7, p.405-410, 2002.

MITTLER, R.; VANDERAUWEVA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGUEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, London, v.9, p.490-498, 2004.

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

MÓYA-LEON, M.A.; JOHN, P. Activity of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in the pulp and peel of ripening bananas. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.69, p.243-250, 1994.

MULAS, M.; LAFUENTE, M.T.; ZACARIAS, L. Effetti della termoterapia sul controllo del danno da freddo nella frigoconservazione a lungo termine dei mandarini Fortune. **Italus Hortus**, Firenze, v.2, p.19-24, 1995.

- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, p. 867-880, 1981.
- NING, B.; KUBO, Y.; INABA, A.; NAKAMURA, R. Effects of storage temperature on the occurrence of chilling injury and storage life in Chinese pear Yali. **Journal of Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v.61, p.461-467, 1992.
- NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen species under control. **Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v.49, p.249-279, 1998.
- PANTASTICO, E.B.; ALI AZIZAN, M.; ABDULLAH, H.; ACEDO, A.L.; DASUKI, I.M.; KOSIYACHINDA, S. Physiological disorders of banana fruit. In: HASSAN, A.B.D.; PANTASTICO, E.B. (Ed.). **Banana: fruit development, postharvest physiology, handling and marketing in asean**. Kuala Lumpur, Malaysia: ASEAN Food Handling Bureau, 1990. p.85-103.
- PANTASTICO, E.B.; GRIERSON, W.; SOULE, J. Chilling injury in tropical fruits: I. Bananas (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* cv. Lacatan). **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.11, p.83-91, 1967.
- PARKIN, K.L.; KUO, S. Chilling injury in cucumbers (*Cucumis sativa* L.) associated with lipid peroxidation as measured by ethane evolution. **Journal of Food Science**, Chicago, v.54, p.1488-1491, 1989.
- PARKIN, K.L.; MARANGONI, A.; JACKMAN, R.; YADA, R.; STANLEY, D. Chilling injury. A review of possible mechanism. **Journal of Food Biochemistry**, San Francisco, v.13, p.127-153, 1989.
- PATHAK, N.; ASIF, M.H.; DHAWAN, P.; SRIVASTAVA, M.K.; NATH, P. Expression and activities of ethylene biosynthesis enzymes during ripening of banana fruits and effect of 1-MCP treatment. **Plant Growth Regulation**, New York, v.40, p.11-19, 2003.
- PAULL, R.E.; CHEN, N.J. Heat shock response in field grown ripening papaya fruit. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, p.623 - 631, 1990.
- PAULL, R.E.; CHEN, N.J. Heat treatments and fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.21, p.21-37, 2000.
- PECH, J.C.; BOUZAYEN, M.; LATCHÉ, A. climacteric fruit ripening: Ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. **Plant Science**, Kidlington, v.175, p.114-120, 2008.
- PESIS, E.; FAURE, M.; ARIE, R. Induction of chilling tolerance in mango by temperature conditioning, heat, low O₂ and ethanol vapors. **Acta Horticulturae**, Leuven, n.455, p.629-634, 1997.

PESIS, E.; ACKERMAN, M.; BEN-ARIE, R.; FEYGENBERG, O.; FENG, X.; APELBAUN, A.; GOREN, R.; PRUSKY, D. Ethylene involvement in chilling injury symptoms of avocado during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.24, p.171–181, 2002.

PONGPRASERT, N.; KANLAYANARAT, S.; GEMMA, H.; SEKOZAWA, Y.; SUGAYA, S. Postharvest n-propyl dihydrojasmonate and abscísico acid application on reducing chilling injury in banana peel. **Acta Horticulturae**, Leuven, n.712, p.741-746, 2006.

PORAT, R.; WEISS, B.; COHEN, L.; DAUS, A.; GOREN, R.; DROBY, S. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of ‘Shamouti’ oranges. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.15, p.155-163, 1999.

PORAT, R.; PAVONCELLO, D.; PERETZ, J.; BEN-YEHOSHUA, S.; LURIE, S. Effects of various heat treatments on the induction of cold tolerance and on the postharvest qualities of ‘Star Ruby’ grapefruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.18, p.159–165, 2000.

POSMYK, M.M.; BAILLY, C.; SZAFRÁNSKA, K.; JANA, K.M.; CORBINEAU, F. Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedling. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.162, p.403–412, 2005.

PRASAD, T.K.; ANDERSON, M.D.; MARTIN, B.A.; STEWART, C.R. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. **Plant Cell**, Rockville, v.6, p.65-74, 1994.

PROMYOU, P.; KETSA, S.; VAN DOORN, W. Hot water treatments delay cold-induced banana peel blackening. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.48, p.132–138, 2008.

PURVIS, A.C.; SHEWFELT, R.L. Does the alternative polyamine pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.88, p.712-718, 1993.

PURVIS, A.C. Regulation of oxidative stress in horticultural crops. **HortScience**, Alexandria, v.39, p.930-932, 2004.

QUEIROZ, C.G.S.; ALONSO, A.; MARES-GUIA, M.; MAGALHAES, A.C. Chilling induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabica* L. roots. **Biologia Plantarum**, Praha, v.41, p.403–413, 1998.

RAISON, J.K.; ORR, G.R. Proposals for a better understanding of the molecular basis of chilling injury. In: WANG, C.Y. (Ed.). **Chilling Injury of Horticultural Crops**. Boca Raton: CRC Press, , 1990. p.145-164.

RAMASSAMY, S.; OLMOS, E.; BOUZAYEN, M.; PECH, J.C.; LATCHÉ, A. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase of apple fruit is periplasmic. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.49, p.1909-1915, 1998.

RASKIN, I. Role of salicylic acid in plants. **Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v.43, p.439-463, 1992.

RIOV, J.; YANG, S.F. Autoinhibition of Ethylene Production in Citrus Peel Discs. **Plant Physiology**, Rockville, v.69, p.687-690, 1982.

RIVERA, C.F.; RODRIGUEZ, S.Z.; DÍAS DE LEÓN, S.F.; BÓSQUEZ, M.E.; DOMÍNGUEZ, S.J.; CHÁVEZ, F.S.; CAJUSTES, B.J. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes of refrigerated Persian limes (*Citrus latifolia* Tanaka) as influenced by a prestorage hot treatment. **Journal of Food Biochemistry**, San Francisco, v.28, p.305-317, 2004.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, Oxford, v.66, p.401-436, 1999.

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**, Amsterdam, v.5, p.119-127, 1995.

ROMANI, R.G.; HESS, B.M.; LESLIE, C.A. Salicylic acid inhibition of ethylene production by apple discs and other plant tissues. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.8 p.63-69, 1989.

SALA, J.M. Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold-stored mandarin fruits. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.13, p.255-261, 1998.

SALA, J.M.; LAFUENTE, M.T. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.20, p.81-89, 2000.

SALA, J.M.; LAFUENTE, M.T. Catalase in the heat-induced chilling tolerance of cold-stored hybrid Fortune mandarin fruits. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v.47, p.2410-2414, 1999.

SALIN, M.L. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.72, p.681-689, 1988.

SALTVEIT, M.E. The rate of ion leakage from chilling-sensitive tissue does not immediately increase upon exposure to chilling temperatures. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.26, p.295-304, 2002.

SALTVEIT, M.E.; MORRIS, L.L. Overview on chilling injury of horticultural crops. In: WANG, C.Y. (Ed.). **Chilling Injury of Horticultural Crops**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.3-15.

SALVADOR, A.; CARVALHO, C.P.; MONTERDE, A.; MARTÍNEZ-JÁVEGA, J.M. 1-MCP Effect on chilling injury development in 'Nova' and 'Ortanique' mandarins. **Food Science and Technology International**, London, v.12, p.165-170, 2006.

SALVADOR, A.; ARNAL, L.; MONTERDE, A.; CUQUERELLA J. Reduction of chilling injury symptoms in persimmon fruit cv. 'Rojo Brillante' by 1-MCP. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.33, p.285-291, 2004.

SANCHEZ-BALLESTA, M.T.; LLUCH, Y.; GOSALBES, M.J.; ZACARIAS, L.; GRANELL, A.; LAFUENTE, M.T. A survey of genes differentially expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in citrus fruit. **Planta**, Berlin, v.218, p.65-70, 2003.

SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; DEL RÍO, L.A. Localization of manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisum sativum* L. **Plant Science**, Kidlington, v.51, p.1-8, 1987.

SANIEWSKI, M.; CZAPSKI, J.; NOWACKI, J.; LANGE, E. The effect of methyl jasmonate on ethylene and 1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid production in apple fruits. **Biologia Plantarum**, Praha, v.29, p.199-203, 1987.

SAPITNITSKAYA, M.; MAUL, P.; McCOLLUM, G.T.; GUY, C.L.; WEISS, B.; SAMACH, A.; PORAT, R. Postharvest heat and conditioning treatments activate different molecular responses and reduces chilling injuries in grapefruit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.57, p. 2943-2953, 2006.

SARUYAMA, H.; ONODERA, H.; UEMURA, M. Transgenic rice plants expressing wheat catalase show improved tolerance for chilling-induced damage in membranes. In: TORIYAMA, K.; HEONG, K.L.; HARDY, B. (Ed.). **Rice is Life: Scientific Perspectives in the 21st Century**. WORLD RICE RESEARCH, 2004. Tsukuba, Japan, p.4-7.

SARUYAMA, H.; TANIDA, M. Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and - tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**, Kidlington, v.109, p.105-113, 1995.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, p.7-12, 1993.

SCANDALIOS, J.G. Regulation and properties of plant catalases. In: FOYER, C.H.; MULIUNEUX, P.M. (Ed.). **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. Orlando: CRC Press, 1994, p. 275-315.

SCHIRRA, M. Behavior of Star Ruby grapefruits under chilling and non-chilling storage temperature. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.2, p. 315–327, 1992.

SCHIRRA, M.; D'HALLEWIN, G. Storage performance of Fortune mandarins following hot water dips. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.10, p.229-238, 1997.

SCHIRRA, M.; MULAS, M.; FADDA, A.; CAULI, E. Cold quarantine responses of blood oranges to postharvest hot water and hot air treatments. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.31, p.191–200, 2004.

- SELVARAJAH S.; BAUCHOT, A.D.; JONH, P. Internal browning in cold-stored pineapples is suppressed by a postharvest application of 1-methylcyclopropene. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.23, p.167-170, 2001.
- SEMIKHATOVA, O.A. Maintenance Respiration and the Cost of Plant Adaptation. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v.42, p.312–319, 1995.
- SERRANO, M.; MARTÍNEZ-MADRID, M.C.; PRETEL, M.T.; RIQUELME, F.; ROMOJARO, F. Modified atmosphere packaging minimizes increases in putrescine and abscisic acid levels caused by chilling injury in pepper fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.45, p.1668–1672, 1997.
- SEVILLANO, L.; SANCHEZ-BALLESTA, M.T.; ROMOJARO, F.; FLORES, F.B. Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact. **Journal of Food Science and Agriculture**, Washington, v.89, p.555-573, 2009.
- SEYMOUR, G.B.; JOHN, P.; THOMPSON, A.K. Inhibition of degreening in the peel of bananas ripened at tropical temperatures. II. Role of ethylene, oxygen and carbon dioxide. **Annals of Applied Biology**, Warwik, v.110, p.153-161, 1987.
- SHAH, J. The salicylic acid loop in plant defense. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.6, p.365-371, 2003.
- SHEWFELT, R.L.; PURVIS, A.C. Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders. **HortScience**, Alexandria, v.30, p.213-218, 1995.
- SISLER, E.C.; BLANKENSHIP, S.M. Diazocyclopentadiene (DACP), a light sensitive reagent for the ethylene receptor in plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.12, p.125-132, 1993.
- SMITH, I.K.; VIERHELLER, T.L.; THORNE, C.A. Assay of glutathione reductase in crude tissue-homogenates, using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.125, p.27-58, 1988.
- SOTO-ZAMORA, G.; YAHIA, E.M.; BRECHT, J.K.; GARDEA, A. Effects of postharvest hot air treatments on the quality and antioxidant levels in tomato fruit. **LWT**, Zurich, v.38 p.657 – 663, 2005.
- SRIVASTAVA, M.K.; DWIVEDI, U.N. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. **Plant Science**, Kidlington, v.158, p.87-96, 2000.
- SUZUKI, N.; MITTLER, R. Reactive oxygen species and temperature stress: a delicate balance between signaling and destruction. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.126, p.45-51, 2006.
- TASNEEM, A. **Postharvest treatments to reduce chilling injury symptoms in stored mangos**. 2004. 122p. (Thesis) – MacGill Univerity, Montreal, Canada, 2004.

- THOMPSON, J.E.; BROWN, J.H.; PALYATH, G.; TODD, J.F.; YAO, K. Membrane phospholipid catabolism primes the production of activated oxygen in senescing tissues. In: PELL, E.J.; STEFFEN, K.L. (Ed.). **Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism, current topics in plant physiology**. Rockville: 1991. p.57-66.
- TOIVONEN, P.M.A. The reduction of browning in parsnips. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.67, p.547-551, 1992.
- TORRES, M.A.; DANGL, J.L. Functions of respiratory burst oxidase in abiotic interactions, abiotic stress and development. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.8, p.397-403, 2005.
- USHIMARU, T.; OGAWA, W.; ISHIDA, N.; SHIBASAKA, M.; KANEMATSU, S.; ASADA, K.; TSUJI, H. Changes in organelle superoxide dismutase isozymes during air adaptation of submerged rice seedlings: differential behavior of isozymes in plastids and mitochondria. **Planta**, Berlin, v.112, p.606-613, 1995.
- VAN BREUSEGEM, F.; VRANOVÁ, E.; DAT, J.F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Kidlington, v.161, p.405-414, 2001.
- VERCESI, A.E.; BORECKÝ, J.; MAIA, I.G.; ARRUDA, P.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H. Plant uncoupling mitochondrial proteins. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.57, p.383-404, 2006.
- VIEIRA SANTOS, C.L.; CAMPOS, A.; AZEVEDO, H.; CALDEIRA, G. In situ and in vitro senescence induced by KC1 stress: nutritional imbalance, lipid peroxidation and antioxidant metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.52, p.351-360, 2001.
- VIERLING, E. The role of heat shock proteins in plants. **Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v.42, p.579-620, 1991.
- VITÓRIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry**, Oxford, v.57, p.701-710, 2001.
- WANG, C.Y. Approaches to reduce chilling injury of fruits and vegetables. **Horticultural Review**, Leuven, v.15, p.63-95, 1993.
- WANG, C.Y. Effect of temperature preconditioning on catalase, peroxidase, and superoxide dismutase in chilled zucchini squash. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.5, p.67-76, 1995.
- WANG, C.Y. Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress. **HortScience**, Alexandria, v.17, p.173-186, 1982.

WANG, C.Y. Relation of chilling stress to ethylene production. In: LI, P.H (Ed.). **Low temperature stress physiology in crops**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p.177-189.

WANG, C.Y.; ADAMS, D.O. Chilling-induced ethylene production in cucumbers (*Cucumis sativus* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 69, p. 424 – 427, 1982.

WANG, C.Y.; BUTA, J.G. Methyl jasmonate reduces chilling injury in *Cucurbita pepo* through its regulation of abscisic acid and polyamine levels. **Environmental Experimental Botany**, Amsterdam, v.34, p.427-432, 1994.

WANG, C.Y.; SAMS, C.E.; GROSS, K.C. Ethylene, ACC, soluble polyuronide, and cell wall noncellulosic neutral sugar content in 'Eldorado' pears during cold storage and ripening. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.110, p.687-691, 1985.

WANG, L.J.; LI, S.H. Thermotolerance and related antioxidant enzyme activities induced by heat acclimation and salicylic acid in grape (*Vitis vinifera* L.) leaves. **Plant Growth Regulation**, New York, v.48, p.137-144, 2006.

WANG, Y.; LU, W.; JIANG, Y.; LUO, Y.; JIANG, W.; JOYCE, D. Expression of ethylene-related expansin genes in cool-stored ripening banana fruit. **Plant Science**, Kidlington, v.170, p.962-967, 2006.

WHITAKER, B.D. Lipid changes in mature-green tomatoes during ripening, during chilling, and after rewarming subsequent to chilling. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.119, p.994-999, 1994.

WHITAKER, B.D. Lipid changes in immature-green bell pepper fruit during chilling at 2°C and after transfer to 20°C subsequent to chilling. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.93, p.683-688, 1995.

WISMER, W.V. Low temperature as a causative agent of oxidative stress in postharvest crops. In: HODGES, D.M. (Ed.). **Postharvest oxidative stress in horticultural crops**. New York: Food Product Press, 2003. 266p.

WOOLF, A.B.; BOWEN, J.H.; FERGUSON, I.B. Preharvest exposure to the sun influences postharvest responses of 'Hass' avocado fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.15, p.143-153, 1999.

WOOLF, A.B.; WATKINS, C.B.; BOWEN, J.H.; LAY-YEE, M.; MAINDONALD, J.H.; FERGUSON, I.B. Reducing external chilling injury in stored Hass avocados with dry heat treatments. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, p. 1050-1056, 1995.

WOOLF, A.B.; BALL, S.; SPOONER, K.J.; LAY-YEE, M.; FERGUSON, I.B.; WATKINS, C.B.; GUNSON, A.; FORBES, S.K. Reduction of chilling injury in the sweet persimmon Fuyu during storage by dry air heat treatments. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.11, p. 155–164, 1997.

YANG, S.F. Regulation of ethylene biosynthesis. **HortScience**, Alexandria, v.15, p.238-243, 1980.

YANG, R.F.; CHENG, M.T.S.; SHEWFELT, R.L. The effect of high temperature and ethylene treatment on the ripening of tomatoes. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.136, p.941-942, 1990.

YU, Y.B.; ADAMS, D.O.; YANG, S.F. Inhibition of ethylene production by 2,4-dinitrophenol and high temperature. **Plant Physiology**, Rockville, v.66, p.286–290, 1980.

YUEN, C.M.C.; TRIDJAJA, N.O.; WILLS, R.B.H.; WILD, B.L. Chilling injury development of ‘Tahitian’ lime, ‘Emperor’ mandarin, ‘Marsh’ grapefruit and ‘Valencia’ orange. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.67, p.335-339, 1995.

ZACARIAS, L.; LAFUENTE, M.T.; MARCOS, J.F.; SALADIE, M. DUPILLE, E. Regulation of ethylene biosynthesis during cold storage of the chilling sensitive Fortune mandarin fruit. In: VENDELL, M. KLEE, H.; PECH, J.C.; ROMOJARO, F. (Ed.). **Biology and Biotechnology of the plant hormone ethylene**. Amsterdam: IOS press, 2003. p.112-117.

ZHANG, J.; HUANG, W.; PAN, Q.; LIU, Y. Improvement of chilling tolerance and accumulation of heat shock proteins in grape berries by heat pretreatment. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.38, n. 1, p. 80-90, 2005.

ZHENG, Y.; FUNG, R.W.; WANG, S.Y.; WANG, C.Y. Transcript levels of anti oxidative genes and oxygen radical scavenging enzyme activities in chilled zucchini squash in response to super atmospheric oxygen. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.47, p.151-158, 2008.

ZHANG, J.; CUI, S.; LI, J.; WEI, J.; KIRKHAM, M.B. Protoplasmic factors, antioxidant responses, and chilling resistance in maize. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.33, p.567-575, 1995.

ZHOU, H.W.; BEN-ARIE, R.; LURIE, S. The role of ethylene in the prevention of chilling injury in nectarines. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.158, p.55-61, 2001.

ZYKOVA, V.V.; KOLESNICHENKO, A.V.; VOINIKOV, V.K. Involvement of reactive oxygen species in plant mitochondrial response to low-temperature stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v.49, p.269-276, 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)