

## **ESTRESSE OXIDATIVO DE AMEIXAS 'LAETITIA' FRIGOCONSERVADAS SUBMETIDAS SIMULTANEAMENTE AO TRATAMENTO TÉRMICO E APLICAÇÃO DE ETANOL**

Angélica Schmitz Heinzen<sup>1</sup>  
Monica Farias<sup>2</sup>  
Tiago Miqueloto<sup>1</sup>  
Deysi Jhoana Camayo Mosquera<sup>1</sup>  
Laís Dieb de Lima<sup>1</sup>  
Jéssica Mayumi Anami<sup>1</sup>

**RESUMO:** A ameixa possui um curto período de vida pós-colheita, mesmo em armazenamento refrigerado, devido a rápida perda de firmeza e ao escurecimento da polpa. O escurecimento de polpa está associado a fatores como ponto de colheita, tempo de armazenamento, estresse oxidativo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento térmico e da aplicação de vapor de etanol sobre o estresse oxidativo no tecido da polpa dos frutos. Os frutos foram provenientes de um pomar comercial situado no município de Vacaria, RS, na safra de 2014/15. Os tratamentos avaliados foram controle e tratamento térmico (37°C/24 h) + vapor de etanol (0,15%). Cada tratamento foi composto de quatro repetições e unidade experimental constituída de 20 frutos. Os frutos foram armazenados (1±0,2°C e 92±2% de UR) durante 35 dias. O tratamento térmico + Etanol reduziu o teor de compostos fenólicos totais e reduziu a atividade antioxidante os frutos, reduziu a permeabilidade de membrana aos 4 dias, aumentou a incidência de escurecimento de polpa e atividade da enzima superóxido dismutase em relação ao controle. Não houve diferença em relação a peroxidação de lipídios, peróxido de hidrogênio e atividade da peroxidase. A aplicação de etanol e tratamento térmico é eficiente na redução do estresse oxidativo de ameixas 'Laetitia' durante o armazenamento. Mas se não são aplicados de acordo com a concentração ideal para o fruto, pode-se ocorrer fitotoxidez nos mesmos, aumentando neste caso o escurecimento de polpa no fruto.

Palavras-chave: mecanismo de defesa, distúrbio fisiológico, *Prunus salicina*.

## **OXIDATIVE STRESS OF FRIGOCONSERVED PLANT 'LAETITIA' SUBMITTED SIMULTANEOUSLY TO THERMAL TREATMENT AND APPLICATION OF ETHANOL**

<sup>1</sup> Pós-graduanda pelo programa de Produção Vegetal, CAV-UDESC

<sup>2</sup> Acadêmica de Agronomia, CAV-UDESC

**ABSTRACT:** Plum has a short post-harvest life, even in refrigerated storage, due to the rapid loss of firmness and the darkening of the pulp. Pulp darkening is associated with factors such as harvest point, storage time, oxidative stress. The objective of this work was to evaluate the effect of the heat treatment and the application of ethanol vapor on the oxidative stress in the pulp tissue of the fruits. The fruits were from a commercial orchard located in the municipality of Vacaria, RS, in the 2014/15 harvest. The treatments evaluated were control and heat treatment (37 ° C / 24 h) + ethanol vapor (0.15%). Each treatment was composed of four replicates and an experimental unit consisting of 20 fruits. The fruits were stored (1 ± 0.2 ° C and 92 ± 2% RH) for 35 days. The treatment + Ethanol reduced the total phenolic compounds content and reduced the antioxidant activity of the fruits, reduced membrane permeability at 4 days, increased the incidence of pulp darkening and superoxide dismutase enzyme activity in relation to the control. There was no difference in relation to peroxidation of lipids, hydrogen peroxide and peroxidase activity. The application of ethanol and heat treatment is efficient in reducing the oxidative stress of 'Laetitia' plums during storage. But if they are not applied according to the ideal concentration for the fruit, phytotoxicity can occur in them, increasing in this case the darkening of pulp in the fruit.

Keywords: defense mechanism, physiological disorder, *Prunus salicina*.

## INTRODUÇÃO

Ameixas possuem alta perecibilidade e o armazenamento sob baixa temperatura é recomendado para prolongar a vida pós-colheita e promover uma melhor manutenção da qualidade (BRACKMANN et al., 2003). No entanto, o armazenamento refrigerado prolongado pode acarretar em significativas perdas na qualidade dos frutos devido ao amolecimento e a incidência de distúrbios fisiológicos, que resultam na redução da aceitabilidade do consumidor (ALVES, et al., 2010).

As ameixas 'Laetitia' desenvolvem escurecimento mais severo nos tecidos da polpa próximo ao caroço, semelhante ao sintoma de dano por frio descrito por Crisosto et al. (2004). Os sintomas de dano por frio em frutas de caroço (*Prunus* spp.) variam em função da espécie e cultivar, e são identificados pela perda da capacidade de amadurecer após a refrigeração e por alterações indesejáveis da textura como polpa endurecida, 'lanosa', farinácea ou gelatinosa, com perda da suculência e da aparência (polpa escurecida, avermelhada ou translúcida, e descoloração irregular da região vermelha da epiderme) (CRISOSTO, 2004). Tem sido proposto que o distúrbio é decorrente de um processo oxidativo relacionado à produção de espécies reativas de oxigênio e à redução na eficiência dos sistemas antioxidantes, com consequente danos às membranas celulares (SINGH; SINGH, 2012; 2013a, b).

O estresse oxidativo ocorre quando a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) excede a capacidade da planta para manter a homeostase celular, ou, quando

a produção de espécies reativas de oxigênio excede a capacidade da planta para eliminá-los (HODGES, 2003). As enzimas superóxido dismutase (SOD) são metaloenzimas de um grupo que protege as células de  $O_2^-$  radicais por catalisar a dismutação de  $O_2^-$  a  $O_2$  molecular e  $H_2O_2$  (HODGES, 2003). Atividade SOD tem sido associada a estresses fisiológicos, tais como a baixa temperatura, luz de alta intensidade, o estresse hídrico e estresse oxidativo (BOWLER et al., 1992). As enzimas peroxidases (PODs) têm muitos substratos que agem como doadores de hidrogênio na presença de  $H_2O_2$ . Devido a ampla especificidade de substrato e a presença de muitas isoformas, tem sido difícil atribuir uma função específica para a isoforma associada para um determinado compartimento ou tecido celular (HODGES et al., 2004). As PODs estão envolvidas em muitos processos relacionados com o crescimento, incluindo a extensão da parede celular, lignina, biogênese e catabolismo de auxina (HODGES et al., 2004).

O tratamento térmico, por inibir o amadurecimento e induzir a resistência a danos por frio e auxiliar na manutenção da aparência externa dos frutos durante a armazenagem (AGHDAM et al., 2013; WU et al., 2015). Estudos preliminares demonstraram que o tratamento térmico durante 24 horas em temperaturas entre 35 e 40°C reduz a incidência do escurecimento da polpa de ameixas 'Laetitia'. O tratamento térmico estimula os mecanismos de defesa antes dos frutos serem submetidos ao frio, o que estabelece uma resistência cruzada, com as respostas decorrentes da exposição a temperaturas moderadas ou altas, permanecendo atuantes durante a exposição a temperaturas mais baixas (WANG et al., 2003; KLUGE et al., 2006).

Estudos demonstram que o vapor de etanol pode ser adotado como tratamento complementar à refrigeração visando à conservação da qualidade dos frutos (LICHTER et al., 2006). O etanol apresenta efeito sobre diversos frutos climatéricos, podendo melhorar a manutenção dos atributos de qualidade, dependendo da espécie (PESIS, 2005). Ritenour et al. (1997) descobriram que as respostas ao tratamento parecem ser dependentes de fatores que provavelmente incluem espécie, cultivar, maturidade, concentração aplicada, modo de aplicação e duração de exposição. Liu et al. (2012) verificaram que a aplicação pós-colheita de etanol pode reduzir a concentração interna de etileno, retardar a senescência de melões doces e melhorar os níveis de compostos aromáticos voláteis, especialmente os ésteres etílicos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento térmico e da aplicação de etanol, o possível efeito sinérgico desses dois tratamentos sobre o

estresse oxidativo no tecido da polpa dos frutos e escurecimento de polpa em ameixas 'Laetitia' armazenadas sob refrigeração.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado com ameixas 'Laetitia' provenientes de um pomar comercial do município de Vacaria, RS (28° 31'51" S de latitude, 50°48'31" O de longitude e 970 m de altitude), colhidas na safra 2014/2015. Os frutos foram colhidos, e conduzidos até o laboratório para a homogeneização das amostras experimentais e posteriormente a aplicação dos tratamentos. Antes da homogeneização das amostras os frutos com danos físicos, podridões, rachaduras e coloração (totalmente vermelha ou com coloração menor que 30 % de cor vermelha) foram eliminados. Os tratamentos consistiram em controle (sem tratamento pós-colheita) e tratamento térmico a 37°C durante 24 horas com exposição dos frutos ao vapor de etanol (0,15%).

Para a aplicação dos tratamentos térmicos os frutos foram acondicionados em temperatura de 37°C em câmaras incubadora tipo B.O.D. (marca Eletrolab) por 24 horas (h). Para aplicação do vapor de etanol, os frutos de cada amostra foram pesados e acondicionados no interior de recipientes de 4100 mL que permitiram o fechamento hermético. O volume de etanol líquido, necessário para atingir a concentração de 0,15% foi adicionado em placas de Petri de 35 mL (diâmetro de 50 mm), que foram acondicionadas no interior dos recipientes, antes do fechamento dos mesmos. A relação volume de etanol/kg de fruto média foi de 5 mL kg<sup>-1</sup>. A exposição dos frutos ao vapor de etanol foi durante 24 horas em condições ambiente (20±5°C e UR de 63±2%). Após a aplicação dos tratamentos os frutos foram armazenados durante 35 dias a 1 ± 0,2°C e 92 ± 2% de UR.

Após o período de armazenamento seguidos de mais três dias em exposição a condições ambiente, para simular o período de comercialização, os frutos foram avaliados quanto aos atributos de qualidade. Após os três dias em condições ambiente os frutos foram avaliados quanto a textura (forças de ruptura da casca e penetração da polpa), incidência de escurecimento da polpa, teor de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante total (AAT; pelos métodos DPPH e ABTS), atividade enzimática da peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD), espécies reativas de oxigênio (EROs) para peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radical superóxido e peroxidação de lipídios.

A incidência de escurecimento da polpa foi avaliada por meio da contagem das ameixas que apresentaram regiões internas da polpa com qualquer tipo de escurecimento, sendo determinada a proporção de frutos afetados (%).

Para a quantificação de compostos fenólicos totais (CFT) e da atividade antioxidante total (AAT) foram obtidos extratos da polpa de ameixa, utilizando-se uma amostra de 5 g de polpa triturada em mixer vertical, marca Philips Walita, modelo RI1364 (Varginha, Brasil). A amostra foi homogeneizada com 10 mL de etanol (Synth, Diadema, Brasil) acidificado (0,01% de HCl), seguido de centrifugação a temperatura de 4 °C por 10 minutos, a 10000 rpm em centrífuga eppendorf, modelo 5810R, (Hamburgo, Alemanha). Após a filtragem, o sobrenadante foi reservado para análise de CFT e AAT.

A determinação de CFT foi realizada empregando o reagente Folin-Ciocalteu. A curva padrão foi obtida com ácido gálico (BIOTEC, Pinhais, Brasil), nas concentrações de 0, 10, 30, 50, 70, 90 e 100 ppm. Para análise foram adicionados 2,5 mL de Folin-Ciocalteu (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA) (1:3), 0,5 mL de amostra diluída (1:20) e 2,0 mL da solução de carbonato de sódio (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) 10%. Os tubos foram agitados em vortex incubados por uma hora em ausência de luz. Realizou-se a leitura no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 765 nm em leitora de microplacas, modelo EnSpire (PerkinElmer, USA). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g de massa fresca da amostra (mg EAG.100 g<sup>-1</sup>).

A determinação da AAT foi baseada na extinção da absorção dos radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil) e ABTS (2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico). O método DPPH foi analisado de acordo com Vizzotto et al. (2012). Em ambiente escuro, foram pipetados 200  $\mu$ L de amostra e misturados com 3.800  $\mu$ L de radical DPPH (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA) em tubos de 15 mL com tampa. Os tubos foram agitados e deixados para reagir por 24 horas. A leitura foi realizada em leitora de microplacas, modelo EnSpire (PerkinElmer, USA) a 525 nm, e os resultados expressos em  $\mu$ g de equivalente Trolox.g<sup>-1</sup> de massa fresca da amostra. O método ABTS foi analisado conforme descrito por Rufino et al. (2007) com adaptações. Em ambiente escuro, foram pipetados 30  $\mu$ L de amostra e misturados com 3.000  $\mu$ L de radical ABTS (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA). A leitura foi realizada após reação de 6 minutos em leitora de microplacas, modelo EnSpire (PerkinElmer, USA) a 734 nm, e os resultados expressos em  $\mu$ g de equivalente Trolox.g<sup>-1</sup> de massa fresca da amostra.

A quantidade de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi determinado de acordo com o método proposto por Gay, Collins e Gebicki (1999) e Hermes- Lima, Willmore Storey (1995), com modificações. Um grama da amostra foi macerada em nitrogênio líquido e homogeneizado em 10 ml de metanol (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) a 0°C, com auxílio de ultraturrax Heidolph, modelo D-91126 (Schwabach, Alemanha). Após a completa homogeneização as amostras foram centrifugadas a temperatura de 4 °C por 10 minutos, a 10000 rpm com auxílio de uma centrífuga eppendorf, modelo 5810R, (Hamburgo, Alemanha). Em seguida retirou-se uma alíquota de 35  $\mu$ L do sobrenadante, à qual foi pipetado em um recipiente contendo 500  $\mu$ L de sulfato de amônio ferroso  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$  1 mM (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) e 200  $\mu$ L de ácido sulfúrico  $H_2SO_4$  250 mM (MERCK, Darmstadt, Alemanha) que permaneceu em reação por 5 minutos no escuro. Em seguida adicionou-se 100  $\mu$ L de xylenol laranja 1 mM (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA) e a mistura foi mantida no escuro por 20 minutos quando então procedeu-se à leitura da absorbância das amostras a 560 nm em leitora de microplacas, modelo EnSpire (PerkinElmer, USA). As leituras foram comparadas com uma curva padrão com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) e expressas em ( $\mu$ mol  $g^{-1}$ ).

A atividade da peroxidase (POD) foi determinada de acordo com o método proposto por Kar e Mishra (1976), com modificações. Para obtenção do extrato enzimático foi macerado 0,3 g do tecido da polpa com 3 mL do meio de extração composto de tampão fosfato de potássio 0,1 M (Vetec, Duque de Caxias, Brasil), pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM (Dinâmica, Diadema, Brasil), fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM (SIGMA, St. Louis, USA). A atividade da peroxidase (POX) foi determinada pela adição de 600  $\mu$ L do extrato enzimático em um tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, guaiacol 20 mM e  $H_2O_2$  20 mM. O decréscimo na absorbância a 420 nm, na temperatura de 25 °C, foi medida durante 1 minuto da reação com auxílio de uma leitora de microplacas modelo EnSpire (PerkinElmer, USA) a 420 nm, durante 1 minuto.. A atividade das POX foi determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 0 a 1 minutos e expressa em  $\mu$ mol  $min^{-1}mg$  proteína $^{-1}$  uma centrífuga eppendorf, modelo 5810R, (Hamburgo, Alemanha).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com o método proposto por Del Longo et al. (1993), com modificações. Para obtenção no meio de extração, o tecido vegetal foi macerado em Nitrogênio líquido, posteriormente foi utilizado 0,3 g do tecido vegetal, e posteriormente adicionado 3 mL do meio de

extração, composto de tampão fosfato de sódio 0,1 M (Vetec, Duque de Caxias, Brasil), pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM (Dinâmica, Diadema, Brasil), fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM (SIGMA, St. Louis, USA). Após a homogeneização em almoxafariz, mantido em gelo picado, as amostras foram acondicionados em eppendorfs e centrifugadas a temperatura de 4 °C por 15 minutos, a 10000 rpm com auxílio de uma centrífuga eppendorf, modelo 5810R, (Hamburgo, Alemanha). Posteriormente retirou-se uma alíquota de 50 µL do sobrenadante que foi adicionada a 2,95 mL do meio de reação, composto de tampão de fosfato de sódio 50 mM (Vetec, Duque de Caxias, Brasil), pH 7,8, metionina 13 mM (Vetec, Duque de Caxias, Brasil), azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM (Vetec, Duque de Caxias, Brasil), EDTA 0,1 mM (Dinâmica, Diadema, Brasil) e riboflavina 2 µM (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) que estavam acondicionados em recipientes de vidro recobertos com e sem papel alumínio e que em seguida foram mantidas a exposição a luz por 10 minutos. A quantificação da atividade enzimática foi determinada no comprimento de onda de 560 nm com auxílio de uma leitora de microplacas, modelo EnSpire (PerkinElmer, USA) e expressa em expressa em  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg proteína}^{-1}$ .

A quantificação da peroxidação de lipídeos nas membranas celulares foi realizada conforme procedimento descrito por Heath e Packer (1968) com modificações. Para isso, 0,3 g de tecido da polpa dos frutos foram macerados em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA; 0,1%), colocados em eppendorfs e centrifugados a 10.000 rpm C [centrífuga eppendorf, modelo 5810R, (Hamburgo, Alemanha)] por 15 minutos a 4 °. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 350 µL do sobrenadante e adicionado em um tubo (eppendorf) contendo 1,5 mL de TCA (20%) e 0,5% de ácido tiobarbitúrico (MERCK, Darmstadt, Alemanha). As amostras foram incubadas por 25 minutos à temperatura de 90-95 °C e, em seguida, acondicionadas em banho de gelo para deter a reação. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos e quantificadas nos comprimentos de onda de 400, 532 e 600 nm com auxílio de um leitor de microplacas (modelo EnSpire, PerkinElmer, USA). A determinação da integridade de membrana (peroxidação de lipídeos) foi expressa em  $\text{nmol g}^{-1}\text{ MF de MDA formado}$ .

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Cada tratamento foi composto de quatro repetições, sendo cada unidade experimental constituída de 25 frutos. Os valores em % foram previamente transformados pela fórmula arco seno  $[(x+0,5)/100]^{1/2}$ . Os dados foram submetidos à análise de variância e

as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), com o auxílio do programa SAS (SAS Institute, Cary, NC, EUA).

## RESULTADOS

Tabela 1 - Conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT; mg EAG.100 g<sup>-1</sup>) e atividade antioxidante total (AAT; quantificada pelos métodos DPPH e ABTS, expressa em µg de equivalente Trolox.g<sup>-1</sup> de massa fresca), incidência (%) de escurecimento de polpa em ameixas 'Laetitia' submetidas a diferentes tratamentos pós-colheita e armazenadas sob refrigeração (temperatura de 1±0,2°C e 92±2% de UR) durante 35 dias seguidos de três dias em condições ambiente (temperatura 20±5°C e 63±2% de UR).

Tratamento	Compostos Fenólicos totais	Atividade antioxidante total		Incidência (%)
		DPPH	ABTS	
Controle	203,3 a	6170 <sup>ns</sup>	10,78 a	46,66 b
37°C/24h + Etanol	124,2 b	5540,60	8,55 b	72,76 a
CV (%)	11,82	14,3	12,5	13,43

Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ns: não significativo ( $p > 0,05$ ). Etanol na concentração de 0,15% v/v.

Tabela 2 - Permeabilidade de membranas (%), valores de peroxidação de lipídios (MDA; nmol g<sup>-1</sup> MF), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; µmol g<sup>-1</sup>), atividade das enzimas peroxidase (POD; µmo<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> proteína) superóxido dismutase (SOD; µmo<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> proteína) em ameixas 'Laetitia' submetidas a diferentes tratamentos pós-colheita e armazenadas sob refrigeração (temperatura de 1±0,2°C e 92±2% de UR) durante 35 dias seguidos de três dias em condições ambiente (temperatura de 20±5°C e 63±2% de UR).

Tratamento	Permeabilidade		Eros		Enzimas	
	1 dia	4 dias	MDA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	POD	SOD
Controle	40,4 <sup>ns</sup>	44,9 a	1,78 <sup>ns</sup>	23,2 <sup>ns</sup>	19,6 <sup>ns</sup>	1,84 b
37°C/24h + Etanol	37,90	24,2 b	2,69	19,30	23,40	2,74 a
CV (%)	17,8	26,7	41,5	12,1	14,8	10,2

Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ns: não significativo ( $p > 0,05$ ). Etanol na concentração de 0,15% v/v.

## DISCUSSÃO

O teor de compostos fenólicos totais (CFT), foi menor no tratamento com tratamento térmico a 37°C por 24 horas mais vapor de etanol (tabela 1). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados por plantas durante o desenvolvimento normal, e em resposta a condições de estresse tais como infecções, ferimentos, radiação ultravioleta (UV), entre outras. As plantas contêm fenóis simples,



ácidos fenólicos (derivados do ácido benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanas e ligninas. Estes compostos fenólicos podem atuar atraindo polinizadores, contribuindo na pigmentação, como antioxidantes, e como agentes protetores contra luz ultravioleta, patógenos, predadores, entre outras funções (NACZK; SHAHIDI, 2006). O estresse causado aos frutos, em razão do armazenamento refrigerado, pode ativar o metabolismo secundário das células, que é uma das rotas formadoras de compostos fenólicos (DING et al., 2001), o que explica o incremento no teor de fenóis totais, presentes em frutos de nêspera ao longo do armazenamento (EDAGI et al., 2009).

A atividade antioxidante total (ATT), determinada pelo método DPPH não houve diferença entre os tratamentos, já a ATT determinada pelo método ABTS o tratamento térmico com etanol foi maior em relação ao controle (tabela 1). Kristl et al. (2011) observaram que a evolução da maturação resultou em aumento na ATT de ameixas. A redução nos CFT e AAT em ameixas 'Laetitia' tratadas com vapor de etanol pode estar relacionada ao fato deste tratamento ter reduzido a taxa de produção de etileno e conseqüentemente o amadurecimento. Em geral, ameixas tem uma atividade antioxidante mais elevada do que as nectarinas e pêssegos (GIL et al., 2002). De acordo com Rotili et al. (2013), a atividade antioxidante em frutos é decorrente da ação de uma variedade de compostos que são degradados ou sintetizados durante o armazenamento, em resposta a estresses bióticos e abióticos.

A aplicação de etanol em conjunto com o tratamento térmico reduziu a severidade do escurecimento da polpa (Tabela 1). Em ameixas tem sido proposto que o escurecimento da polpa é decorrente de um processo oxidativo relacionado à produção de espécies reativas de oxigênio, que causam a peroxidação de lipídeos, com conseqüente danos às membranas celulares (SINGH; SINGH, 2013a). Quando o fruto está sob estresse e o equilíbrio entre a produção de EROs e a atividade antioxidante é rompido a favor dos compostos oxidantes, ocorrem danos oxidativos nas estruturas celulares (KIM; KWAK, 2010). As enzimas antioxidantes estão presentes em diferentes compartimentos celulares e contribuem para o controle das EROs em plantas, o que confere um estado de homeostase celular (BARBOSA et al., 2014). Além disso, o escurecimento de polpa em frutos pode ser decorrente da redução do metabolismo energético e do conteúdo de fosfolipídios, com conseqüente descompartimentalização intracelulares (PEDRESCHI et al., 2009).

A peroxidação de lipídios e a permeabilidade no dia 1 não teve diferença, porém aos 4 dias a permeabilidade de membrava foi menor no tratamento térmico mais aplicação de etanol (tabela 2). Aghdam e Bodbodam (2014) sugeriram que o tratamento com ar quente aumenta a manutenção da integridade da membrana e a tolerância a injúria por frio, por meio da diminuição significativa de fosfolipase D e atividade da enzima lipoxigenase (LOX). Essa maior resistência pode estar relacionada à manutenção da estrutura, à permeabilidade das membranas e ao incremento na atividade de sistemas antioxidantes, que auxiliam na remoção de substâncias tóxicas acumuladas durante o período de exposição à baixa temperatura (YAHIA et al., 2007).

O conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou diferença não houve diferença (tabela 2) Shao e Tu (2013) relataram que o tratamento com ar quente atenuou o dano por frio em nesperas, que foi associado com a diminuição do teor de lignina, que pode ser atribuído à diminuição do acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Shao e Tu (2013) sugeriram que o tratamento térmico poderia diminuir a acumulação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes (SOD, APX, GR e CAT), reduzindo a peroxidação de ácidos graxos insaturados de membranas e mantendo uma maior relação ácidos graxos insaturados/ácidos graxos saturados.

Não houve diferença na atividade da POD (tabela 2). A POD desempenha um papel importante no crescimento das plantas, desenvolvimento, e diferenciação, pois catalisa a oxidação de vários substratos (por exemplo, fenóis, aminas aromáticas), utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Apresenta importantes funções fisiológicas, que incluem, aqueles em lignificação, remoção de espécies reativas de oxigênio altamente tóxicas, a biossíntese de etileno e da defesa contra agentes patogénicos (FERNÁNDEZ-TRUJILLO et al., 2003). A remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por peroxidases requer uma pequena molécula redutora (ou proteínas como o citocromo c ou tioredoxina) para agir como um cofator de regeneração e não leva à evolução de O<sub>2</sub>, porque a água é o produto da reação (MHAMDI et al., 2012). A POD utiliza o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante e composto de natureza fenólica como doadores de elétrons.

A maior atividade da SOD foi no tratamento térmico mais etanol (tabela 2). A SOD é a primeira enzima ativada em reações de peroxidação e a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode servir como um mensageiro químico no caso de um eventual estresse, antes de ser metabolizado pela CAT e POD. As SODs são metalo-enzimas consideradas a primeira linha de defesa contra as ROS e que catalisam a dismutação de dois radicais

O<sub>2</sub><sup>-</sup>, gerando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>. Essas enzimas participam da modulação do nível de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos (BHATTACHARJEE, 2010).



## CONCLUSÕES

A aplicação de etanol e tratamento térmico é eficiente na redução do estresse oxidativo de ameixas 'Laetitia' durante o armazenamento. Mas se não são aplicados de acordo com a concentração ideal para o fruto, pode-se ocorrer fitotoxidez nos mesmos, aumentando neste caso o escurecimento de polpa no fruto.

## REFERÊNCIAS

AGHDAM, M. S. et al. Heat shock proteins as biochemical markers for postharvest chilling stress in fruits and vegetables. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 160, p. 54-64, 2013.

AGHDAM, M. S.; BODBODAK, Samad. Postharvest heat treatment for mitigation of chilling injury in fruits and vegetables. *Food and Bioprocess Technology*, New York, v. 7, n. 1, p. 37-53, 2014.

ALVES E.O. et al. Amadurecimento de kiwis 'Bruno' submetidos ao dano mecânico de impacto e ao tratamento com 1-metilciclopropeno. *Bragantia*, Campinas, v. 69, n. 3, p.753-758, 2010.

BARBOSA, M. R. et al. Plant generation and enzymatic detoxification of reactive oxygen species. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Enfi eld: Science Publishers, Jodhpur, 2010.

BOWLER, Chris; MONTAGU, M. van; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual review of plant biology*, v. 43, n. 1, p. 83-116, 1992.

BRACKMANN, A. et al. Armazenamento de pêssegos 'Chimarrita' em atmosfera controlada e sob absorção de etileno. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.33, n.3, p.431-435, 2003.

CRISOSTO, C.H. et al. Increasing 'Blackamber' plum (*Prunus salicina* Lindell) consumer acceptance. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v.34, n.3, p.237-244, 2004.

DEL LONGO, O. T. et al. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic

conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant and Cell Physiology*, Córdoba v. 34, n. 7, p. 1023-1028, 1993.

DING, C.K. et al. Metabolism of phenolic compounds during loquat fruit development. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Davis, v.49, p.2883-2888, 2001.

EDAGI, F. K. et al. Potential increasing in the cold-storage of 'Fukuhara' loquat using heat treatments. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 44, n. 10, p. 1270-1276, 2009.

FERNÁNDEZ-TRUJILLO, J. P. et al. Peroxidase activity and superficial scald development in apple fruit. *Journal of agricultural and food chemistry*, Davis, 51(24), 7182-7186, 2003.

GAY, C.; COLLINS, J.; GEBICKI, J.M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Analytical Biochemistry*, San Diego, v. 273, p.149–155, 1999.

GIL, M. I., et al. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Davis, 50(17), 4976-4982, 2002.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*. San Francisco, v. 125, n. 2, p. 189-198, 1968.

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. Mark. *Postharvest oxidative stress in horticultural crops*. CRC Press, 2003.

HODGES, D. M. et al. Oxidative stress: importance for postharvest quality. *Hort Science*, Alexandria, v. 39, n. 5, p. 924-929, 2004.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant physiology*, Oxford, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.

KIM, Y.H.; KWAK, S.S. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In: GUPTA, S.D. *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Enfield: Science Publishers, Jodhpur, 2010. p.129-150.

KLUGE, R.A. et al. Efeitos de tratamentos térmicos aplicados sobre frutas cítricas armazenadas sob refrigeração. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, p.1388-1396, 2006.

KRISTL, J. et al. Extractable antioxidants and non-extractable phenolics in the total antioxidant activity of selected plum cultivars (*Prunus domestica* L.): Evolution during on-tree ripening. *Food Chemistry*, Amsterdam, v. 125, n. 1, p. 29-34, 2011.

LICHTER, A.; GABLER, F.M.; SMILANICK, J.L. Control os spoilage in table grapes. *Stewart Postharvest Review*, Quebec, v.6, n.1, p.1-10, 2006.

- LIU, W.W. et al. Ethanol treatment inhibits internal ethylene concentrations and enhances ethyl ester production during storage of oriental sweet melons (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino). *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v.67, p.75-83, 2012.
- MHAMDI, A.; NOCTOR, G.; BAKER, A. Plant catalases: peroxisomal redox guardians. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Amsterdam, v. 525, n. 2, p. 181-194, 2012.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Amsterdam, v. 41, 1523 – 1542, 2006.
- PEDRESCHI, R. et al. Metabolic profiling of 'Conference' pears under low oxygen stress. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 123-130, 2009.
- PESIS, E. The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. *Postharvest Biology and Technology*. Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 1-19, 2005.
- RITENOUR, M.A. et al. Ethanol effects on the ripening of climacteric fruit. *Postharvest Biology Technology*. Amsterdam, v.12, p.35–42, 1997.
- ROTILI, M. C. C. et al. Composição, atividade antioxidante e qualidade do maracujá amarelo durante armazenamento. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 34, n. 1, p. 227-240, 2013.
- RUFINO, M do S.M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2007. 4p. (Comunicado Técnico, 128).
- SHAO, X.; TU, K. Hot air treatment improved the chilling resistance of loquat fruit under cold storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, Oxford, v. 38, n. 2, p. 694-703, 2013.
- SINGH, S.P.; SINGH, Z. Controlled and modified atmospheres influence chilling injury, fruit quality and antioxidative system of Japanese plums (*Prunus salicina* Lindell). *International Journal of Food Science and Technology*, Oxford, v.48, p.363-374, 2013a.
- SINGH, S.P.; SINGH, Z. Postharvest cold storage-induced oxidative stress in Japanese plums (*Prunus salicina* Lindl. cv. Amber Jewel) in relation to harvest maturity. *Australian Journal of Crop Science*, Lismore, v.7, p.391-400, 2013b
- WANG, W.X.; VINOGRAD, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, v.218, p.1-14, 2003.
- WU, Z.; et al. Heat acclimation reduces postharvest loss of table grapes during cold storage – Analysis of possible mechanisms involved through a proteomic approach. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v.105, p.26-33, 2015.

VIZZOTO, M. et al. Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em diferentes genótipos de amoreira-preta (*Rubus* sp.). Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.34, n.3, p.853-858, 2012.

YAHIA, E.M. et al. Postharvest hot air treatment effects on the antioxidant system in stored mature-green tomatoes. Postharvest Biology and Technology, Amsterdam, v.44, p.107-115, 2007.