

TERESA DRUMMOND CORREIA

EFEITO DO DANO FÍSICO SOBRE O METABOLISMO DE FOLHAS DE
TAIOBA, *Xanthosoma sagittifolium* (L.) SCHOTT.

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA

MINAS GERAIS- BRASIL

2009

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFRV**

T

C824e
2009

Correia, Teresa Drummond, 1982-
Efeito do dano físico sobre o metabolismo de folhas de
taioaba, *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott / Teresa
Drummond Correia – Viçosa, MG, 2009.
viii, 44f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Raimundo Santos Barros
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 38-44

1. *Xanthosoma sagittifolium* - Folhas - Fisiologia
pós-colheita. 3. *Xanthosoma sagittifolium* – Folhas – Perdas
pós-colheita I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 633.68

TERESA DRUMMOND CORREIA

**EFEITO DO DANO FÍSICO SOBRE O METABOLISMO DE FOLHAS DE
TAIOBA, *Xanthosoma sagittifolium* (L.) SCHOTT.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de fevereiro de 2009.

Prof. Fernando Luiz Finger
(Coorientador)

Pesq. Dimas Mendes Ribeiro
(Coorientador)

Prof. Mário Puiatti

Pesq. Marialva Alvarenga Moreira

Prof. Raimundo Santos Barros
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me iluminar e por permitir tantos momentos de alegrias!!

Aos meus pais, pelo amor, carinho e por sempre acreditarem em mim, me dando as mãos nos momentos mais difíceis dessa caminhada. Amo vocês!

Ao Moisés por sempre me dar força e me incentivar. Por estar ao meu lado em momentos tão valiosos da minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de crescimento profissional.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos “meus orientadores” Fernando Luiz Finger e Raimundo Santos Barros, pela orientação, pelos valiosos ensinamentos, paciência e amizade.

À Dimas Mendes Ribeiro pela valiosa co-orientação e ensinamentos.

Ao professor Mário Puiatti e à pós-doutora Marialva Alvarenga Moreira, por participarem da banca de defesa e pelas sugestões que tanto engrandeceram meu trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Pós-colheita, Geraldo e Sebastião pela ajuda na realização dos experimentos.

Aos funcionários da Horta Nova, pelo auxílio no campo.

Aos amigos do Laboratório de Pós-colheita pela ajuda nos experimentos e pelas boas risadas, que foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho. Foi muito bom!

Aos grandes amigos de BH, da Agronomia, da Letras (né, Sheilinha?) e da Fisiologia Vegetal. Vocês me trouxeram muitos momentos de alegrias e risadas durante o curso, mesmo alguns estando tão distantes daqui. Ter amigos como vocês me deixa muito feliz, estão todos bem guardadinhos no meu coração!!!

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho. Muito obrigada!

BIOGRAFIA

TERESA DRUMMOND CORREIA, filha de José Carlos Correia e Marta Maria Drummond, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, em 18 de novembro de 1982.

Em outubro de 2006 graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 2007 iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa (UFV), submetendo-se à defesa de tese em 18 de fevereiro de 2009.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
2.1. Clorofila.....	8
2.2. Etileno e CO ₂	9
2.3. ACC oxidase e CO ₂	9
2.4. Compostos Fenólicos Solúveis.....	10
2.5. Fenilalanina Amônia Liase (PAL).....	10
2.6. Açúcares Solúveis Totais.....	11
2.7. Açúcares Redutores e Não Redutores.....	12
2.8. Amido.....	12
2.9. Porcentagem de massa fresca.....	13
2.10. Análise Estatística.....	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
4. CONCLUSÕES.....	37
5. REFERÊNCIAS	38

RESUMO

CORREIA, Teresa Drummond, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Efeito do dano físico sobre o metabolismo de folhas de taioba, *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott.** Orientador: Raimundo Santos Barros. Co-orientadores: Fernando Luiz Finger, Dimas Mendes Ribeiro e Susan Sôo Han.

Produtos hortícolas, como a taioba, estão sujeitos a vários fatores que causam a deterioração. Dentre esses fatores, o dano mecânico desencadeia uma série de respostas fisiológicas que podem ocorrer no sítio da injúria e nos tecidos adjacentes. O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas em folhas de taioba danificadas, e se essas respostas podem ser transmitidas aos tecidos próximos do local da injúria. Para isto, folhas de taioba foram colhidas e injúrias físicas foram provocadas com o uso de uma agulha. Para verificar se as alterações resultantes da injúria se estendiam para a região vizinha ao local do dano foram feitas perfurações, formando círculos concêntricos de 3 diâmetros: 0,6 cm, círculo A, onde se localizavam os furos de agulha e 1,1 (B) e 1,6 (C) cm em torno do círculo A, formando anéis concêntricos. Como controle foi utilizada a região não danificada da folha. Após 2, 4 e 6 horas da realização do dano foram retiradas amostras para análise da produção de etileno e CO₂. Amostras para avaliação da porcentagem de massa de matéria fresca, acúmulo de compostos fenólicos solúveis, atividade da enzima fenilalanina amônia liase (PAL), açúcares solúveis totais, não

reduzidos, reduzidos e amido foram retirados após 30 minutos, 2, 4 e 6 horas da imposição dos tratamentos; e o teor de clorofila foi verificado após 30 minutos, 24, 48 e 72 horas. Discos intactos e injuriados mecanicamente foram embebidos com ACC para análise da atividade da enzima ACC oxidase e da produção de CO_2 . Amostras foram retiradas após 2, 4 e 6 horas da realização do dano. O dano estimulou a produção de etileno em 39% no disco B e em 41% a produção de CO_2 no disco A, 6 horas após a realização da injúria. No experimento com ACC após 4 horas, o dano induziu aumento de 62% na produção de etileno e de 40% na respiração. Porém, na ausência de ACC, houve estímulo da respiração de até 4 vezes nos discos injuriados. Quanto à porcentagem de massa de matéria fresca, constatamos que os discos injuriados, a partir de 2 horas, apresentaram menores porcentagens de massa comparados aos controles e que esta redução foi mais intensa no círculo A, entretanto, não houve uma consistente redução no teor de clorofila devido ao dano. Após 4 e 6 horas da realização do dano, ocorre estímulo ao acúmulo de fenóis, principalmente no disco A danificado, que apresentou 44 e 50% mais compostos fenólicos solúveis que o controle, respectivamente. Também se verificou maior atividade da PAL no disco A danificado, em todas as horas analisadas. O teor de açúcares solúveis totais, não reduzidos e amido foram maiores nos discos danificados durante todo o experimento. Já os teores de açúcares reduzidos foram maiores no disco A danificado, nos permitindo sugerir que há consumo de reservas no local da injúria, onde a taxa respiratória também foi maior, entretanto, esse consumo não é suficiente para se verificar esgotamento de carboidratos nos discos danificados.

ABSTRACT

CORREIA, Teresa Drummond, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2009. **Effects of wounding on the metabolism of tannia leaves, *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott.** Adviser: Raimundo Santos Barros. Co-advisers: Fernando Luiz Finger, Dimas Mendes Ribeiro and Susan Sôo Han.

Vegetables like leaves of tannia are subject to various factors which cause deterioration. Among these factors, mechanical damage triggers a series of physiological responses that occur at the site of the injury and surrounding tissues. The objective of this study was to evaluate the physiological responses of tannia leaves mechanical damaging, and whether these responses can be transmitted to tissues surrounding the site of injury. For this, the leaves were harvested and mechanical injuries were inflicted by using a needle. To verify that the changes resulting from injury extending to the region adjacent to the site of the damage were drilling, forming concentric circles of 3 diameters: 0.6 cm, circle A, located the needle injured area and 1.1 (B) and 1.6 (C) cm around the circle, forming concentric rings. As control, was used the undamaged region from the leaf lamina. After 2, 4 and 6 hours of damaging, the discs were removed for the analysis of ethylene and CO₂ production. The samples were also used for the assessment of weight loss, accumulation of soluble phenolic compounds, activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL), total soluble sugars, non-reducing and reducing sugars, and starch after 30 minutes, 2, 4 and 6 hours of injury. Chlorophyll content was also determined

after 30 minutes, 24, 48 and 72 hours. Intact and damaged discs were unfiltered with ACC to evaluate the activity of ACC oxidase and production of CO₂, measured after 2, 4 and 6 hours of the tissue being damaged. The injury stimulated ethylene production by 39% in the disc B and 41% in CO₂ production in the disc A, 6 hours after inflicting the damage. The experiment showed that addition of ACC induced an increase of 62% in ethylene production 4 hours after the injury and an increase of 40% in CO₂ production in damaged discs. But, in the absence of ACC respiration was increased up to 4-fold in the injury discs. As the percentage of fresh matter, the injured discs showed lower percentage of mass compared to controls, from 2 hours after the damage, until the end of the experiment, and the reduction was more intense in the circle A; however, there was not a consistent reduction in the level of chlorophyll induced by the damage. The accumulation of phenols was stimulated after 4 and 6 hours after the treatment, especially in the damaged disc A, which showed 44 and 50% more soluble phenolic compounds compared to control discs, respectively at 4 and 6 hours. There was increase in the activity of PAL in the damaged disc A in all the analyzed times. The content of total soluble sugars, non-reducing sugar and starch were higher in damaged discs throughout the experiment. The levels of reducing sugars were higher in the damaged discs, allowing to suggest that occurred higher consumption of reserves at the site of injury, where the respiratory rate was also higher, however, this consumption was not sufficient to cause a depletion of carbohydrates in the damaged discs.

1. INTRODUÇÃO

A taioba, *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott, é uma hortaliça folhosa que se desenvolve, principalmente, em regiões de clima tropical e subtropical, necessitando de elevadas temperaturas e umidade para adequado crescimento. Teve como centro de origem as regiões tropicais da América do Sul e hoje é intensamente cultivada e consumida, como folha ou rizoma, em países da América Central, África e Ásia (Seganfredo et al., 2001).

É considerada boa fonte de minerais, dentre eles ferro, cálcio e fósforo, podendo ser usada em dietas alimentares que visem à suplementação desses constituintes. Aliado a isso, o fato de ser uma cultura de baixo custo, fácil obtenção de mudas, e alta produção de folhas em muitas regiões do Brasil, com total aproveitamento de suas partes (limbo e pecíolo), faz com que o incentivo ao seu consumo seja a forma mais simples de aumentar o valor nutritivo da dieta de populações carentes (Pinto et al., 1999). A taioba também possui níveis de vitamina C comparáveis aos da laranja, que é fonte indicada para o suprimento deste constituinte (Pinto et al., 2001).

No Brasil, a taioba é considerada olerícola de fundo de quintal. O seu consumo e cultivo comercial são pouco expressivos e ocorrem nos estados da Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (Seganfredo et al., 2001). Entre as variedades cultivadas, estão a Taioba Comum, a Taioba Roxa e a BGH/UFV 5932. A produção das folhas varia de 10 a 25 t ha⁻¹ durante o período da colheita, que pode se estender por até 9 meses, dependendo da região do país (Mangan et al., 2008).

Brasileiros que moram nos Estados Unidos (EUA), principalmente nas regiões de Massachusetts e New Jersey, são potenciais consumidores de produtos étnicos, como taioba, maxixe e jiló. Essas hortaliças são cultivadas por produtores norte-americanos e vendidas em redes de supermercados que atendem aos imigrantes brasileiros. Entretanto, a produção dessas hortaliças somente é possível durante o verão norte americano, já que o cultivo no inverno é inviável, devido à baixa

temperatura. Com isso é necessária a importação de folhas de taioba de outros países, entre eles o Brasil, para abastecer o mercado.

Durante o transporte do produto, do ambiente de cultivo até os consumidores, é necessária a utilização de técnicas de conservação pós-colheita que visem manter a qualidade e reduzir as perdas. Dentre os fatores causadores da deterioração da maioria dos produtos hortícolas, podemos citar a elevada taxa respiratória, a transpiração, produção de etileno, doenças pós-colheita, desordens fisiológicas e dano físico (Kader, 2002).

O dano físico não somente ocorre no ambiente de crescimento do produto, mas também no momento da colheita e durante o manuseio pós-colheita e resulta no aumento do metabolismo em geral, acelerando a senescência. Poucos minutos após a injúria, ocorre aumento da respiração, produção de etileno e outras reações bioquímicas responsáveis por mudanças na coloração, textura e qualidade nutricional (açúcares, ácidos e conteúdo de vitaminas) (Cantwell & Suslow, 2002).

A síntese do hormônio etileno é aumentada em resposta a estresses bióticos e abióticos (Saltveit, 1999), como por exemplo, o dano físico, estresses hídrico e salino, infecção por patógenos, entre outros. Particularmente em tecidos vegetativos, como folhas, a injúria mecânica ocasiona aumento, atingindo o pico e em seguida há declínio na produção de etileno (Druege, 2006). Em folhas de tomate injuriadas ocorre estímulo da síntese de etileno 10 minutos após o dano, atingindo o máximo com 60 minutos, seguido de gradual decréscimo da produção do hormônio (Tatsuki & Mori, 1999). Entretanto, não se sabe qual o comportamento do etileno em resposta ao dano em folhas de taioba.

A rota biossintética do etileno inicia-se com a síntese do intermediário S-adenosilmetionina (SAM) a partir do aminoácido metionina. O precursor imediato do etileno, ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), é formado a partir do SAM, pela ação da enzima sintase do ACC e então, o etileno é produzido pela ação da oxidase do ACC (Abeles et al., 1992). Sabe-se que as enzimas-chave da biossíntese do etileno, sintase do ACC e

oxidase do ACC, podem ser induzidas pelo estresse. A atividade de ambas as enzimas foi estimulada em gemas de bambu injuriadas, em que a máxima atividade da sintase do ACC e da oxidase do ACC ocorreu com 24 e 16 horas após a injúria, respectivamente. A produção de etileno estimulada pelo dano atingiu o pico 16 horas após a injúria (Bhowmik & Matsui, 2005).

O etileno induzido pelo estresse estimula outras alterações fisiológicas, como a degradação de clorofilas (Saltveit, 1999), resultando no amarelecimento do produto. Ele promove aumento da atividade das enzimas responsáveis pela degradação da clorofila, as clorofilases e oxidases (Jacomino et al., 2003). Em abobrinhas danificadas há maior amarelecimento nas regiões injuriadas dos frutos quando comparadas às intactas, o que pode ser devido à degradação de clorofila (Durigan & Mattiuz, 2007).

De acordo com Macnicol (1976), o dano resulta em uma série de mudanças metabólicas, entre elas, o aumento na respiração. Altas taxas respiratórias indicam metabolismo mais acelerado e, geralmente, rápida deterioração do produto (Cantwell & Suslow, 2002). Em experimentos com folhas de couve cortadas para produtos minimamente processados, foram obtidos menores níveis de açúcares solúveis e amido quando comparados com as folhas inteiras (Simões, 2004).

O dano também induz ao aumento do metabolismo dos fenilpropanóides, que resulta no acúmulo de compostos fenólicos e subsequente escurecimento do tecido (Saltveit, 2000). Nas plantas, a maioria dos fenóis é derivada da fenilalanina, que por meio da eliminação de uma molécula de amônia, forma o ácido cinâmico, um composto fenólico solúvel. Essa reação é catalisada pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL) (Taiz & Zeiger, 2004).

A PAL é a enzima chave do metabolismo dos fenilpropanóides e está localizada no citoplasma celular. Sua expressão é controlada por uma família de genes e possui regulação diferencial entre os órgãos sob condições de estresse (Hrazdina & Jensen, 1992).

Em alface, a injúria provoca sinais que induzem a síntese de novo da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) e a síntese e acúmulo de compostos fenólicos nas células, em até 2 cm a partir do local do dano, causando escurecimento no tecido (Campos-Vargas & Saltveit, 2002).

Posteriormente, os compostos fenólicos solúveis formados pela ação da PAL sofrem ação da enzima polifenoloxidase (PPO). Esses fenólicos solúveis se acumulam no vacúolo e são utilizados nas reações de escurecimento quando ocorre ruptura das membranas celulares. Isto permite que a enzima PPO, que se localiza nos tilacóides dos cloroplastos e plastídeos, e o substrato, localizado no vacúolo, entrem em contato (Choi et al., 2005). Com isso, são formadas quinonas que levam ao acúmulo de melanina, resultando no escurecimento do produto (Simões, 2004; Toivonen & Brummell, 2008).

Em experimento com segmentos de alface obteve-se aumento da atividade da PAL que iniciou com 4 horas após o dano. A máxima atividade ocorreu 18 horas e a redução 70 horas após o dano. A concentração de fenólicos seguiu o mesmo comportamento da enzima PAL (Choi et al., 2005).

O dano físico também acelera a perda de água do tecido e, como resultado, ocorre redução na turgescência (Toivonen & Brummell, 2008) ou murcha. Esse processo é decorrente da elevada transpiração em conjunto com o fato de o suprimento de água para o órgão vegetal ser interrompido após a colheita (Santos et al., 2001).

Em experimento com mandioquinha salsa, *Arracacia xanthorrhiza*, armazenadas às temperaturas de 24 e 5 °C, observaram-se maiores perdas de massa de matéria fresca nas raízes mecanicamente danificadas em relação àquelas intactas, sob as duas temperaturas avaliadas (Henz et al., 2005).

O dano mecânico também induziu a perda pós-colheita de massa de matéria fresca em quiabos com 6-9, 9-12 e 12-15 cm de comprimento. Entretanto, nos frutos menores a redução da massa ocorreu mais

rapidamente, sugerindo-se que a área lesionada nesses frutos foi proporcionalmente maior que a área afetada nos frutos maiores (Della-Justina et al., 1998)

A injúria produz sinais que migram do local onde ocorreu o dano para tecidos adjacentes não danificados (Saltveit, 2004). Assim, espera-se que as respostas fisiológicas consequentes ao dano, como produção de etileno, perda de massa de matéria fresca, degradação de clorofila, indução da atividade da PAL e acúmulo de fenóis, também sejam detectadas nesses tecidos adjacentes.

Entretanto, não se conhece quais os efeitos das injúrias físicas em folhas de taioba que, depois de danificadas, mostram intenso amarelecimento e escurecimento das folhas no local em que ocorreu o dano e nos tecidos adjacentes.

Baseando-se nisso, os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar as alterações fisiológicas que ocorrem nas folhas de taioba em resposta aos danos físicos;
- Avaliar se essas respostas ocorrem nos tecidos adjacentes ao dano, indicando a existência de uma via de sinalização secundária.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do experimento, utilizaram-se folhas de plantas de taioba produzidas na Horta da Universidade Federal de Viçosa, latitude de 20° 45' sul e altitude de 651m, efetuando-se todos os manejos culturais necessários à cultura desde a implantação do cultivo até o ponto de colheita.

A folha mais nova, totalmente expandida, de cada planta foi colhida entre 7 e 8 h da manhã, nos meses de julho a novembro de 2008. Após a colheita, as folhas foram transportadas para o Laboratório de Pós-Colheita no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa.

As folhas foram uniformizadas quanto à aparência, eliminando aquelas que apresentavam amareladas, murchas ou com danos físicos. Em seguida, tomando como referência a nervura central, em um dos lados da folha (Lado 2 na Figura 1) foram provocadas injúrias físicas com o uso de uma agulha de 0,8 mm de diâmetro, simulando os danos sofridos no campo. Como tratamento controle, utilizou-se o lado da folha que não foi injuriado (Lado 1 na Figura 1). Posteriormente, para verificar se as alterações resultantes da injúria se estendem para a região vizinha ao local do dano, foram feitos círculos concêntricos, a partir do local onde se realizou o dano com a agulha. Dessa forma, utilizou-se furadores com 3 diâmetros diferentes: 0,6 (A); 1,1 (B) e 1,6 (C) cm que provocaram perfurações em torno da injúria física. Em suma, o dano realizado com a agulha (6 a 8 furos) era feito dentro da área abrangida pelo furador com 0,6 cm de diâmetro (círculo A). Ao redor do círculo A, foi utilizado o furador de 1,1 cm (anel B) e ao redor do anel B utilizou-se o furador de 1,6 cm de diâmetro (anel C) (Figura 1 e Figura 2). Assim, os tratamentos foram: círculo A controle e círculo A injuriado; anel B controle e anel B injuriado e anel C controle e anel C injuriado. As amostras de cada um desses tratamentos foram retiradas em diferentes tempos, de acordo com a análise realizada.

Durante todo o período do experimento as folhas permaneceram com o pecíolo mergulhado em baldes com água desionizada para evitar o

murchamento e sob temperatura em torno de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, com intensidade luminosa de $7\text{-}10\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

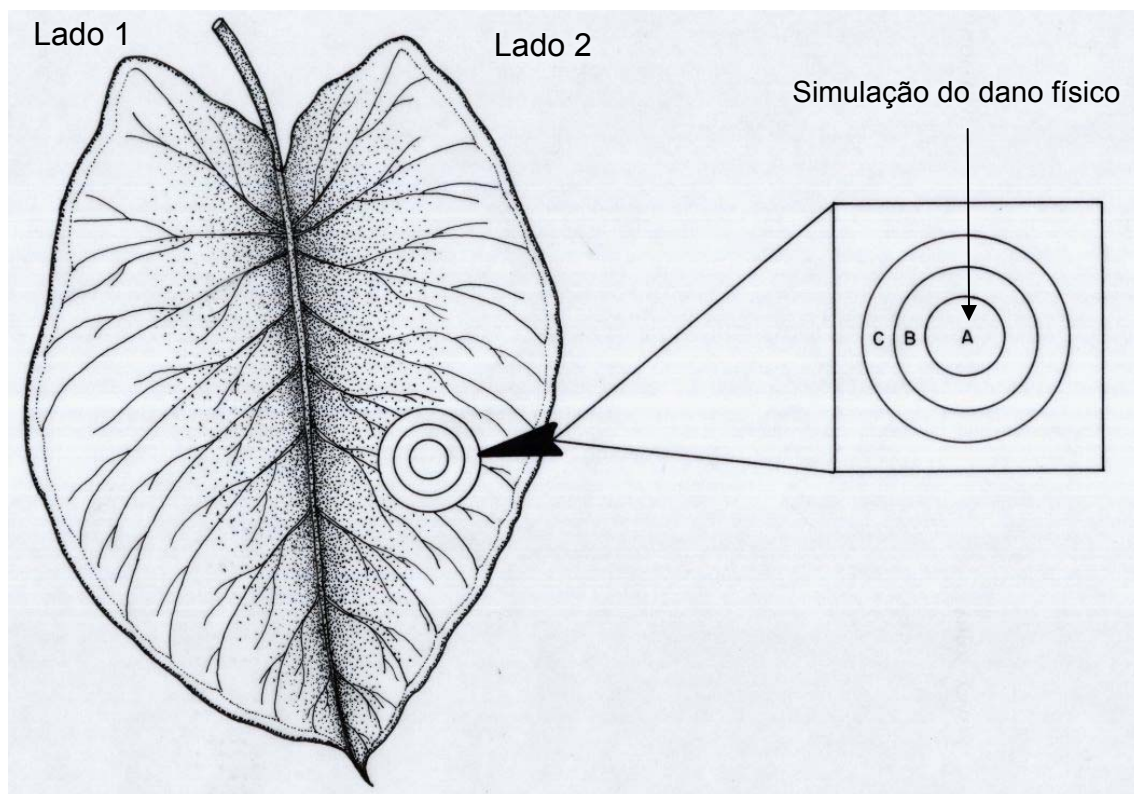


Figura 1: Esquema dos círculos concêntricos realizados com furadores na folha de taioba, simulando danos físicos ocorridos no campo. Diâmetros usados, 0,6 cm (círculo A); 1,1 cm (anel B) e 1,6 cm (anel C). As injúrias se localizavam dentro do círculo A. Lado 1: Círculos concêntricos sem a injúria interna ao A (controle). Lado 2: Círculos concêntricos com injúria interna ao A.



Figura 2: Furadores usados para realização dos círculos concêntricos em folhas de taioba. Diâmetros usados, 0,6 cm (círculo A); 1,1 cm (anel B) e 1,6 cm (anel C). As injúrias, quando presentes, se localizavam dentro do círculo A.

As análises realizadas foram:

2.1. Clorofilas

A análise de clorofilas foi realizada de acordo com a técnica de Arnon (1949), após 30 minutos, 24, 48 e 72 horas da realização do dano. Aproximadamente 0,2 g do material vegetal foram macerados com acetona 80%, em presença de areia lavada e carbonato de cálcio (CaCO_3). Após maceração, procedeu-se à filtragem em papel de filtro, que foi lavado com acetona 80%. O volume foi ajustado para 25 mL, em balão volumétrico. As leituras no espectrofotômetro foram realizadas nos comprimentos de onda de 645 e 663 nm, usando acetona 80% como branco. Os resultados foram expressos em mg g^{-1} de massa de matéria fresca.

2.2. Etileno e CO₂

Para análise da produção de etileno (C₂H₄) e CO₂, 5 a 6 discos foliares de cada tratamento foram colocados em recipientes hermeticamente fechados que continham uma espuma umedecida, permanecendo sob temperatura de 22±1 °C, durante todo o experimento. Amostras foram retiradas após 2, 4 e 6 horas da realização do dano. A análise de produção de etileno foi realizada em cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 5890, série II, com detetor de ionização de chama (FID) e coluna Porapak-N, sendo expressa em $\mu\text{L L}^{-1} \text{ C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. A produção de CO₂ também foi analisada em cromatógrafo a gás, entretanto utilizou-se o modelo CG-14B (Shimadzu Crop Kyoto Japan), com detetor de condutividade térmica (TCD) e coluna Porapak-Q, sendo expressa em $\text{mL CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$.

2.3. Oxidase do ACC e CO₂

A atividade da ACC oxidase foi determinada *in vivo*, de acordo com Whitehead et al (1984). Para isso, 6 discos dos círculos de diâmetro 0,6 cm, danificados ou não, foram infiltrados com 1,0 mM de ACC através de vácuo (40 mmHg) durante 5 minutos, e enquanto o vácuo era eliminado procedeu-se à agitação dos frascos. Este procedimento foi repetido por 4 vezes, até os círculos não mais flutuarem na solução. O controle foi infiltrado com água desionizada. Em seguida, o material vegetal foi transferido para recipientes hermeticamente fechados, que continham uma espuma umedecida, onde permaneceram a 30 °C. As amostras para análise de etileno (C₂H₄) e CO₂ foram retiradas com 2, 4 e 6 horas após a aplicação dos tratamentos e foram analisadas nos cromatógrafos a gás citados anteriormente. A produção de etileno e CO₂ foram expressas em $\mu\text{L L}^{-1} \text{ C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ e $\text{mL CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

2.4. Compostos fenólicos solúveis

O teor de compostos fenólicos solúveis foi determinado de acordo com o método de Prince & Butler (1977), após 30 minutos, 2, 4 e 6 horas da realização da injúria. Aproximadamente 0,1 g do tecido vegetal foram macerados em 2 mL de metanol. Após, o macerado foi centrifugado a 14.000 g durante 15 minutos. Para a determinação dos compostos fenólicos solúveis, 0,5 mL do sobrenadante juntamente com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (diluído 1:3) e 2,0 mL de carbonato de sódio anidro 10 % foram agitados e reagiram durante uma hora. Em seguida realizou-se centrifugação de 14.000 g durante 5 minutos. As leituras no espectrofotômetro foram realizadas no comprimento de onda de 700 nm. A concentração de fenóis solúveis foi expressa em mg de D-catequina g⁻¹ matéria fresca. A curva de calibração foi realizada usando D-catequina como padrão.

2.5. Fenilalanina amônia liase (4.3.1.5 PAL)

A atividade da PAL foi determinada de acordo com Jiang & Joyce (2003). As amostras para determinação da atividade da PAL foram retiradas com 30 minutos, 2, 4 e 6 horas da imposição do dano físico. Assim, aproximadamente 0,5 g de material vegetal foram macerados em 2,0 mL de tampão borato 0,1 M (pH 8,0), contendo 10 % de polivinilpirrolidona (PVP), β-mercaptoetanol 5 mM e EDTA 2 mM. O macerado foi centrifugado a 14.000 g durante 30 minutos e o sobrenadante coletado para análise da atividade da enzima. Todo o processo de extração foi realizado mantendo-se as amostras em banho de gelo. A atividade da enzima foi determinada em 0,5 mL do sobrenadante que, juntamente com tampão borato 0,2 M (pH 8,0) contendo 6 mM de fenilalanina, foram incubados por uma hora a 30 °C. As leituras no espectrofotômetro foram realizadas no comprimento de 290 nm. A atividade da PAL foi expressa em $\Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína. A concentração de proteína nas amostras foi realizada utilizando soroalbumina bovina (Sigma, USA) como padrão, de acordo com Bradford (1976).

2.6. Açúcares solúveis totais (AST)

a) Extração

Aproximadamente 1 g de folhas foi triturado no politron Ultra Turrax com etanol 80% a 60-65 °C e filtrado com papel de filtro. Após 3 lavagens do papel de filtro, o volume do balão foi completado para 50 mL com etanol 80%. O extrato alcoólico foi armazenado em geladeira para posterior quantificação dos açúcares solúveis totais e redutores. O resíduo retido no papel de filtro foi secado em estufa a 65°C por 24 horas e armazenado em dessecadores até o momento da determinação do teor de amido.

As amostras para determinação dos açúcares solúveis totais, redutores, não redutores e amido foram retiradas com 30 minutos, 2, 4 e 6 horas da realização do dano.

b) Quantificação dos açúcares solúveis totais (AST)

Para a quantificação dos açúcares solúveis totais seguiu-se o método Fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956). Primeiramente, realizaram-se diluições de 5 vezes (2 mL do extrato alcoólico, completando o volume com água desionizada para 10 mL). Sempre em duplicata, foi retirada uma alíquota de 250 µL do extrato diluído que foi transferida para tubo de ensaio com rosca. A esta alíquota adicionaram-se 250 µL de fenol 5%. Os tubos foram agitados e adicionaram-se 1,25 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitando-se novamente. Posteriormente, os tubos permaneceram em banho-maria a 30°C, durante 20 minutos. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 490 nm. Os valores obtidos foram comparados com a curva padrão de sacarose 1%. O teor de açúcares solúveis totais foi expresso em % AST.

2.7. Açúcares redutores e não redutores (AR e ANR)

a) Amostras

Foram utilizadas as mesmas amostras do extrato alcoólico usado para quantificação de açúcares solúveis totais.

b) Quantificação dos açúcares redutores e não redutores

A quantificação de açúcares redutores foi realizada pela técnica de Somogy-Nelson (Nelson, 1944). Após diluir 2 vezes as amostras (5 mL do extrato alcoólico, completando-se o volume com água desionizada para 10 mL), sempre em duplicata, uma alíquota de 200 µL foi retirada e transferida para tubo de ensaio com rosca, onde foram adicionados 200 µL do reagente de Nelson (8,0 mL do reagente de Nelson 1 e 2,0 mL do reagente de Nelson 2). Os tubos foram agitados e fervidos por 15 minutos. Após o resfriamento em banho de gelo, adicionou-se 200 µL da solução arsenomolibdica, com posterior agitação dos tubos. Foram adicionados 600 µL de água desionizada e os tubos foram novamente agitados. As leituras no espectrofotômetro foram feitas no comprimento de onda 540 nm. Os valores obtidos foram comparados com a curva padrão de glicose 1%. O teor de açúcares redutores foi expresso em % AR.

Os açúcares não redutores foram estimados subtraindo-se o teor de açúcares redutores do teor de açúcares solúveis totais e foram expressos em % ANR.

2.8. Amido

a) Extração

Para a extração do amido, foi utilizado o resíduo presente no filtro de papel resultante da extração dos açúcares solúveis totais, que foi seco a 65°C durante 24 horas. Seguindo-se a metodologia descrita por McCready et al. (1950), foram adicionados a 0,1 g de material seco 2,5 mL de água desionizada

e 3,25 mL de ácido perclórico 52%, em tubos de centrífuga. Os tubos foram agitados e permaneceram em repouso por 30 minutos. Em seguida, foram centrifugados a 2000 g por 15 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos em provetas de 25 mL. Esse procedimento foi repetido 3 vezes e o volume das provetas foi completado para 25 mL com água desionizada. O extrato foi armazenado em geladeira até o momento da quantificação.

b) Quantificação do amido

Antes de proceder à quantificação de amido, foi realizada diluição de 4 vezes do extrato (2,5 mL do extrato, completando-se o volume com água desionizada para 10 mL). Em seguida, a quantificação de amido foi realizada seguindo-se o mesmo procedimento para quantificação de açúcares solúveis totais. O cálculo para o teor de amido foi feito semelhantemente ao de teor de açúcares solúveis totais, multiplicando-se o valor obtido por 0,9. O teor de amido foi expresso em % amido.

2.9. Porcentagem de massa de matéria fresca dos círculos foliares

As folhas de taioba que continham os tratamentos permaneceram durante todo o experimento com o pecíolo mergulhado em baldes com água desionizada, até o momento determinado para se coletar as amostras, que ocorreu após 30 minutos, 2, 4 e 6 horas da realização do dano. Os círculos foram pesados em balança analítica e os resultados expressos em porcentagem de massa de matéria fresca. O peso determinado após 30 minutos foi considerado como o peso inicial.

2.10. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em delineamento de blocos casualizados, com 4 repetições por tratamento, exceto para o experimento em que se analisou a atividade da enzima oxidase do ACC e CO₂, em que se

utilizou 5 repetições por tratamento. A unidade amostral foi composta por 3 folhas, exceto para as análises da enzima PAL, açúcares solúveis totais, açúcares redutores, não redutores e amido, em que se utilizou 6 folhas. As médias dos tratamentos foram analisadas pelo teste *t* de Student, a 5 % de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença estatística entre os tratamentos, para o círculo A e o anel B, quanto à produção de etileno (Figura 3). Apesar disso, após 4 horas ocorreu aumento de 7 e 26 % no círculo A e no anel B danificados em relação aos intactos, respectivamente (Figura 3b). O anel C controle obteve maior produção estatística de etileno em comparação ao injuriado (Figura 3b). Com 6 horas da realização do dano ocorre redução da produção de etileno no círculo A injuriado, permanecendo alta somente no anel B. O anel B danificado apresentou produção de etileno 39 % maior que o controle (Figura 3c).

Resultado semelhante foi obtido por Siomos et al (2008). Em trabalho com aspargos não foi obtida diferença significativa para o acúmulo de etileno por aspargos intactos e injuriados. Assim, a produção de etileno não foi estimulada pelo dano, de forma semelhante ao encontrado no anel C.

De acordo com Tsouvaltzis et al. (2007), o corte da base de folhas de alho porró resultou no aumento da produção de etileno, atingindo o pico com 24 horas de armazenamento. Em seguida houve declínio, e a produção permaneceu constante após 48 horas. Respostas semelhantes a essa encontrada, também foram obtidas em repolho (Escalona et al., 2006) e alface (Saltveit et al., 2003).

Assim, de acordo com essa análise, verificamos que o dano não causa aumento significativo da produção de etileno em folhas de taioba injuriadas.

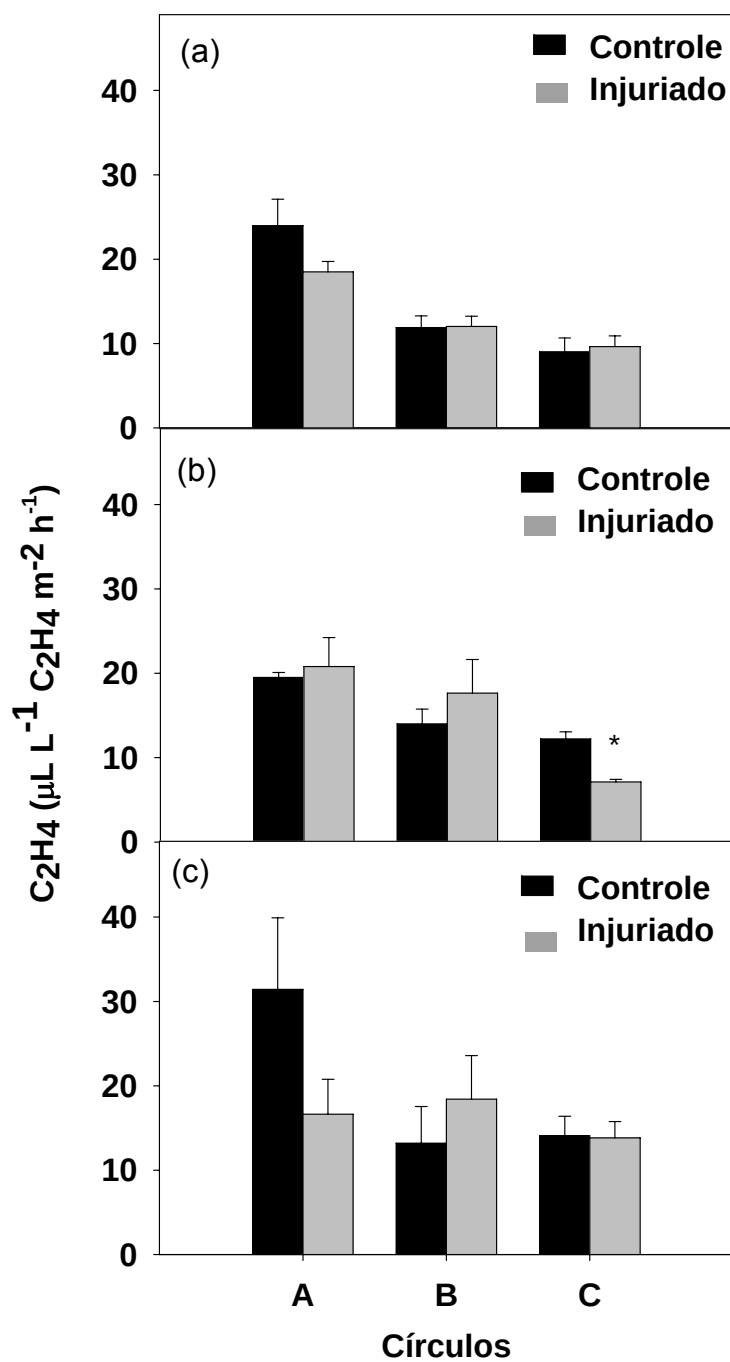


Figura 3: Produção de etileno nos círculos A (0,6 cm de diâmetro) e nos anéis B (1,1 cm de diâmetro) e C (1,6 cm de diâmetro), controles e injuriados, após 2 (a), 4 (b) e 6 (c) horas da realização da injúria. As barras verticais representam o erro padrão da média.

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste *t*.

A produção de CO₂ não foi estatisticamente influenciada pelo dano em nenhum dos tempos analisados (Figura 4). Siomos et al. (2008) também não obteve aumento na produção de CO₂ em aspargos danificados, apresentando valores próximos aos daqueles intactos. Após 2 horas da ocorrência do dano houve aumento de 6 % na produção de CO₂ apenas no anel C injuriado e o círculo A e o anel B controles apresentaram maiores produções de CO₂ que os danificados (Figura 4a). A partir de 4 horas, ocorre aumento na respiração dos tecidos injuriados de 3 e 3 %, e com 6 horas esse aumento foi de 41 e 9 % no círculo A, que foi diretamente danificado, e no anel C, respectivamente (Figuras 4b, 4c). Assim, podemos verificar que, apesar de não apresentar diferença estatística pelo teste *t* a 5 % de probabilidade, a injúria estimula aumento na taxa respiratória do círculo A, a partir de 4 horas da realização do dano, sendo esta resposta mais intensa após 6 horas.

Durigan & Mattiuz (2007) em experimento com frutos de abobrinha danificados, encontraram aumentos nas taxas respiratórias depois de 11 horas da imposição dos tratamentos, naqueles frutos injuriados. Após 24 horas houve decréscimo na respiração.

Serrano et al. (2004) detectou aumento na produção de CO₂ em ameixas danificadas nas primeiras 4 horas seguidas ao dano. Nenhuma alteração da taxa respiratória foi observada naquelas não injuriadas. Em experimentos com alface, Saltveit et al. (2004) obteve respostas semelhantes às acima citadas.

Apesar de se verificar aumento, entretanto não significativo, da produção de etileno e CO₂ em decorrência do dano, essas respostas ocorrem a distâncias diferentes da injúria. O maior aumento da respiração ocorreu no círculo A, no sítio da injúria, e do etileno no anel B, a uma distância de aproximadamente 0,5 cm do local do dano. Essa resposta diferencial pode estar associada a rotas distintas de ativação enzimática. O dano direto causa a ruptura intensa das células e organelas, o que resulta em aumento do processo oxidativo e produção de formas reativas de oxigênio com maior liberação de CO₂. Slesak et al. (2008) obtiveram elevado acúmulo de H₂O₂ em folhas injuriadas de *Mesembryanthemum crystallinum*. Essa resposta foi encontrada

tanto em folhas injuriadas destacadas da planta-mãe, quanto naquelas que sofreram o dano e permaneceram durante todo o experimento na planta. Foi obtido um acúmulo de H_2O_2 máximo 15 minutos após o dano, e posterior decréscimo após 20 minutos.

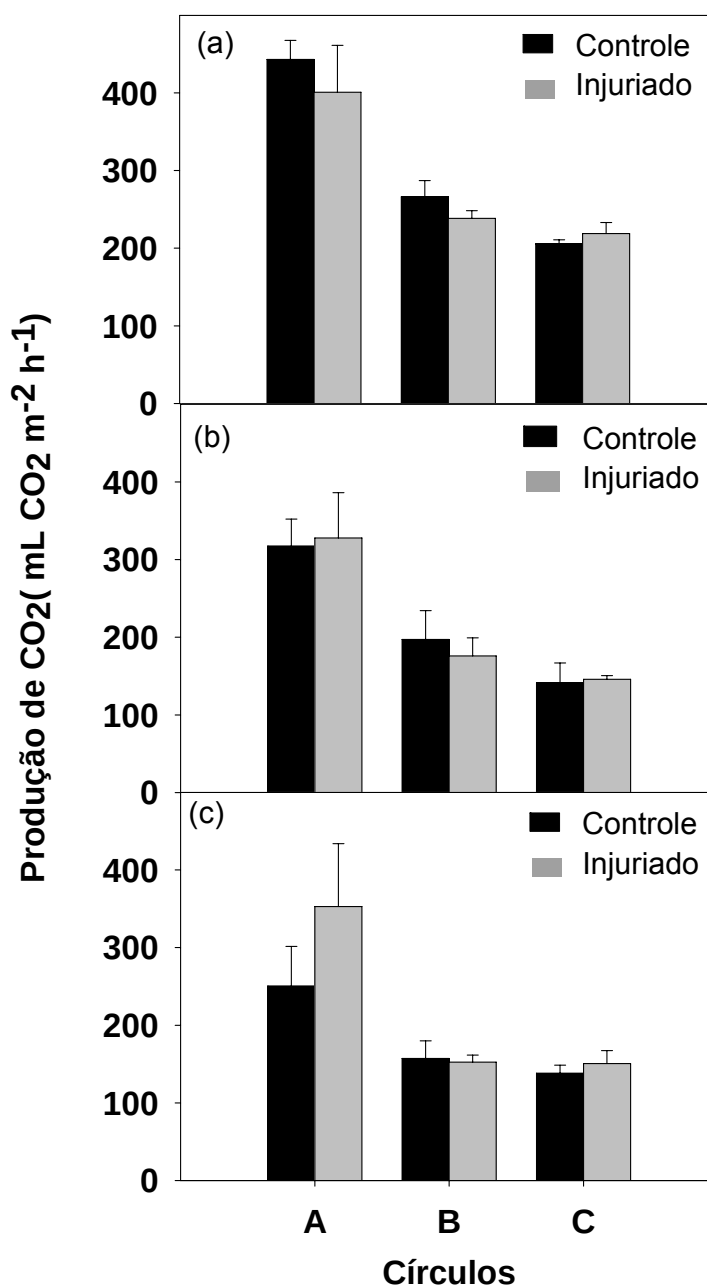


Figura 4: Produção de CO_2 nos círculos A (0,6 cm de diâmetro) e nos anéis B (1,1 cm de diâmetro) e C (1,6 cm de diâmetro), controles e injuriados, após 2 (a), 4 (b) e 6 (c) horas da realização da injúria. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Para verificarmos se no círculo A, diretamente danificado, realmente não houve elevação da produção de etileno e qual seria o motivo dessa resposta, foi realizado experimento com o uso de ACC *in situ*.

Neste experimento foi possível verificar que sem o uso de ACC, não se verifica diferença estatística quanto à produção de etileno entre os círculos controle e danificado (Figura 5). Em todos os tempos analisados verificamos que, se comparado aos círculos não embebidos com ACC, há aumento na produção de etileno nos círculos controles quando usamos ACC. Esse aumento é esperado, pois o ACC é substrato para a produção de etileno, porém esperávamos que essa produção de etileno fosse bem maior nos discos injuriados. Entretanto essa resposta esperada somente foi verificada após 4 horas da realização da injúria, quando se obtém aumento significativo de 62 % no etileno produzido em resposta ao dano (Figura 5b). Essa produção decresce após 6 horas, chegando a valores semelhantes estatisticamente ao do disco não injuriado, resultado semelhante ao obtido 2 horas após a injúria (Figuras 5a, 5c).

Podemos, então, constatar que o dano somente estimula a produção de etileno após 4 horas da realização da injúria mecânica e que a sua baixa produção parece estar associada à falta de substrato (ACC) para a enzima oxidase do ACC.

De acordo com Moura et al. (2005), a oxidase do ACC é uma enzima constitutiva da biossíntese do etileno, de forma que a sintase do ACC poderia ser limitante neste processo. Assim, a enzima sintase do ACC, que sintetiza o ACC, parece ser limitante nas folhas de taioba, não sendo induzida mesmo quando os tecidos são submetidos ao dano. O autor ainda constatou que a menor produção de etileno no tomate mutante 'Firme', não parece estar relacionada com a atividade da oxidase do ACC, e sim, possivelmente, à indisponibilidade de ACC, que é um composto induzido pela enzima sintase do ACC.

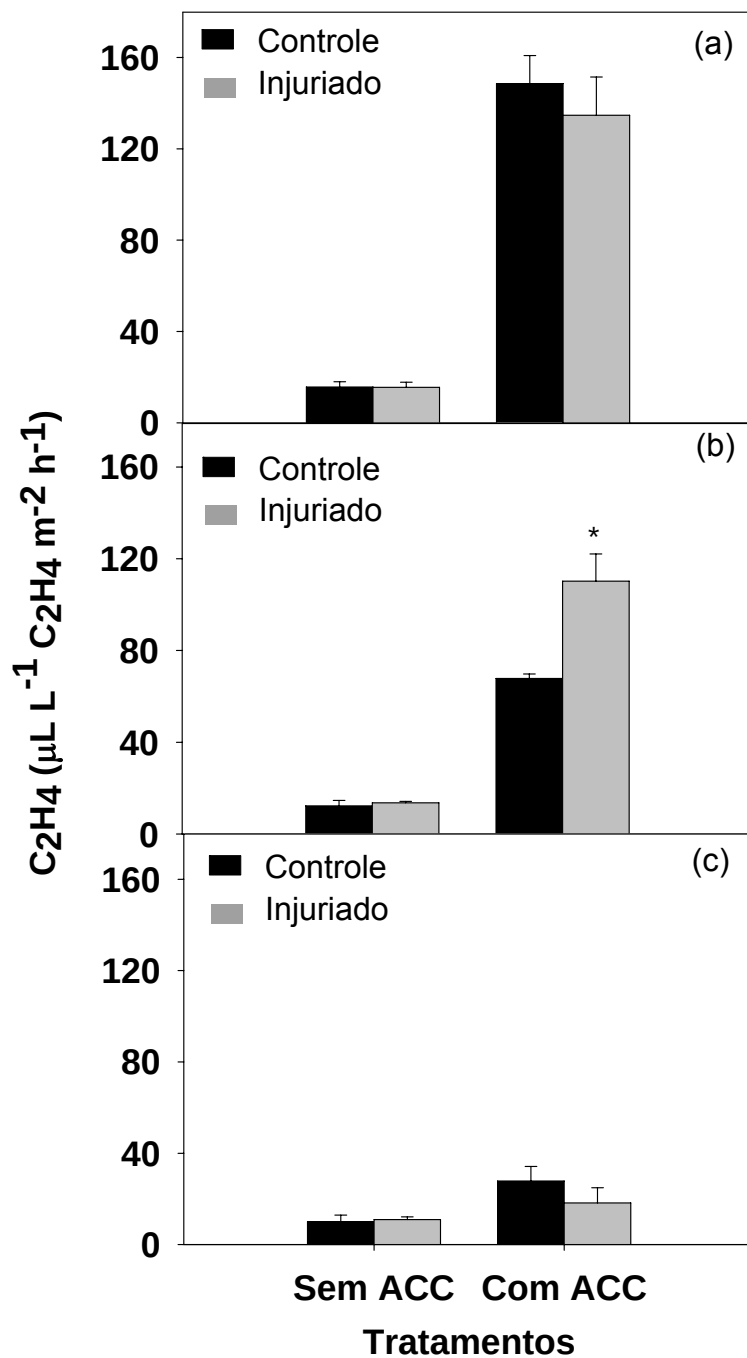


Figura 5: Produção de etileno nos círculos A (0,6 cm de diâmetro) controles e injuriados, embebidos ou não com ACC, após 2 (a), 4 (b) e 6 (c) horas da realização da injúria. As barras verticais representam o erro padrão da média.

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste *t*.

Os discos controle e injuriados infiltrados com ACC apresentaram aumento na taxa respiratória, entretanto, os tecidos danificados apresentaram valores de produção de CO₂ estatisticamente diferentes dos discos controle após 4 horas da realização do dano (Figura 6b). Os círculos controles produziram 19, 60 e 55 % menos CO₂ que os discos danificados, após 2, 4 e 6 horas após a injúria, respectivamente (Figuras 6a, 6b, 6c). Isso pode ter ocorrido, pois o efeito do ACC resulta em maior produção de etileno, que produz CO₂ como um dos produtos finais da reação da oxidase do ACC, o que pode ser somado ao estímulo do processo respiratório decorrente do dano. Linhagens de alface expostas à atmosfera com etileno tiveram incremento da sua atividade respiratória (Saltveit et al., 2003), de forma semelhante a produção de CO₂ nos discos com ACC. Já a produção de CO₂ nos tecidos injuriados não infiltrados com ACC foi estatisticamente maior que nos tecidos intactos em todas as horas analisadas. Os discos danificados apresentaram taxas respiratórias 3, 4 e 3 vezes maiores que os tecidos não injuriados após 2, 4 e 6 horas da realização do dano, respectivamente (Figuras 6a, 6b, 6c), mostrando intenso estímulo à respiração em decorrência do dano.

Em suma, considerando os resultados, constatamos que o dano induz aumento na taxa respiratória do círculo A, sem a existência de correlação com o aumento da produção de etileno, já que essa não foi estimulada pelo dano.

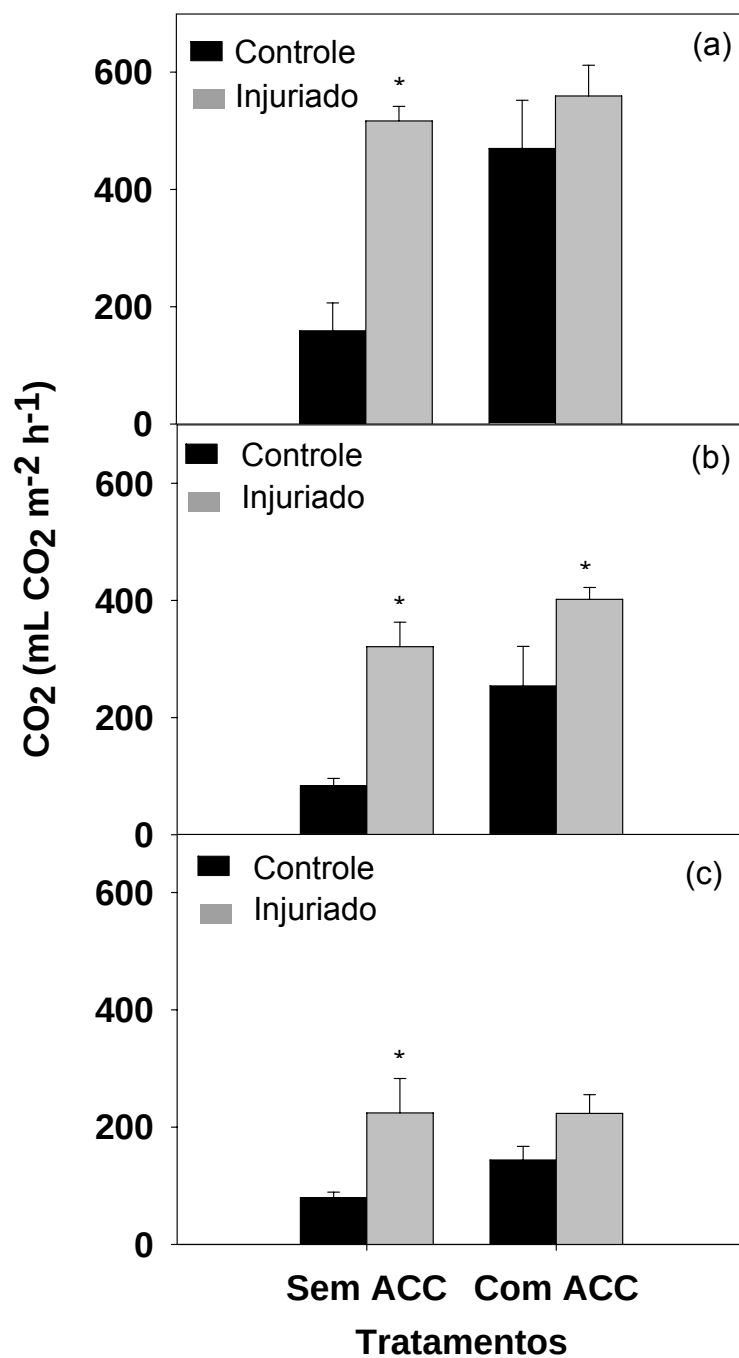


Figura 6: Produção de CO_2 nos círculos A (0,6 cm de diâmetro) controles e injuriados, embebidos ou não com ACC, após 2 (a), 4 (b) e 6 (c) horas da realização da injúria. As barras verticais representam o erro padrão da média.

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste *t*.

Quanto à porcentagem de massa de matéria fresca, verificamos que no momento inicial, 30 minutos após a realização do dano, não há diferença estatística entre os tratamentos controle e injuriado (Figura 7a). Após 2 horas, há redução da porcentagem de massa de matéria fresca em todos os tamanhos de círculos danificados, sendo diferente estatisticamente somente no círculo A, que obteve massa de matéria fresca 39% menor que o controle (Figura 7b). Após 4 horas do dano, ocorre aumento da massa em todos os tamanhos de círculos, danificados ou não. Esse aumento da massa de matéria fresca pode ter ocorrido porque as folhas foram armazenadas com a base do pecíolo em água, permitindo sua absorção, e consequente aumento na massa. Neste momento, o círculo A e o anel B danificados possuem massas 49 e 16 % estatisticamente menores que os mesmos não injuriados, respectivamente (Figura 7c). Todos os círculos danificados tiveram valores estatisticamente menores que os controles após 6 horas da ocorrência do dano. Esta redução na massa de matéria fresca foi de 60 % no círculo A, 23 % no anel B e 13 % no anel C (Figura 7d). Assim, de acordo com esses resultados, constatamos que o círculo A foi o mais afetado pela injúria, apresentando menores valores estatísticos de porcentagem de massa fresca quando comparado ao seu respectivo controle.

Estes resultados são semelhantes àqueles encontrados por Roura et al. (2000). Em folhas de acelga, a maior redução na massa de matéria fresca ocorreu naquelas danificadas, se comparadas às folhas intactas. A perda de massa pode ser atribuída à evaporação da umidade da superfície da folha após lavagem, extravasamento de fluidos celulares causados pela injúria e aumento na permeabilidade da membrana celular devido ao etileno. O aumento da área danificada afeta a organização da superfície do tecido, acelerando a taxa de perda de água pelo vegetal.

Nas folhas de taioba danificadas a principal razão da perda de massa pode ter sido causada pela elevada taxa transpiratória. Em experimentos com abobrinhas intactas e injuriadas por corte, compressão e impacto, constatou-se que aquelas danificadas por corte apresentaram maiores perdas de massa em relação às demais e ao controle. O autor atribui o resultado ao fato de o corte facilitar a perda de água por transpiração devido ao rompimento das estruturas

protetoras da casca (Durigan & Mattiuz, 2007). Em aspargos injuriados também foi constatado menor massa de matéria fresca como resultado ao dano. Aspargos da cultivar ‘Dariana’, quando descascados, tiveram perda de massa 44 % maior que os intactos. Esta resposta ocorre aparentemente devido à remoção das células protetoras da epiderme (Siomos et al., 2008).

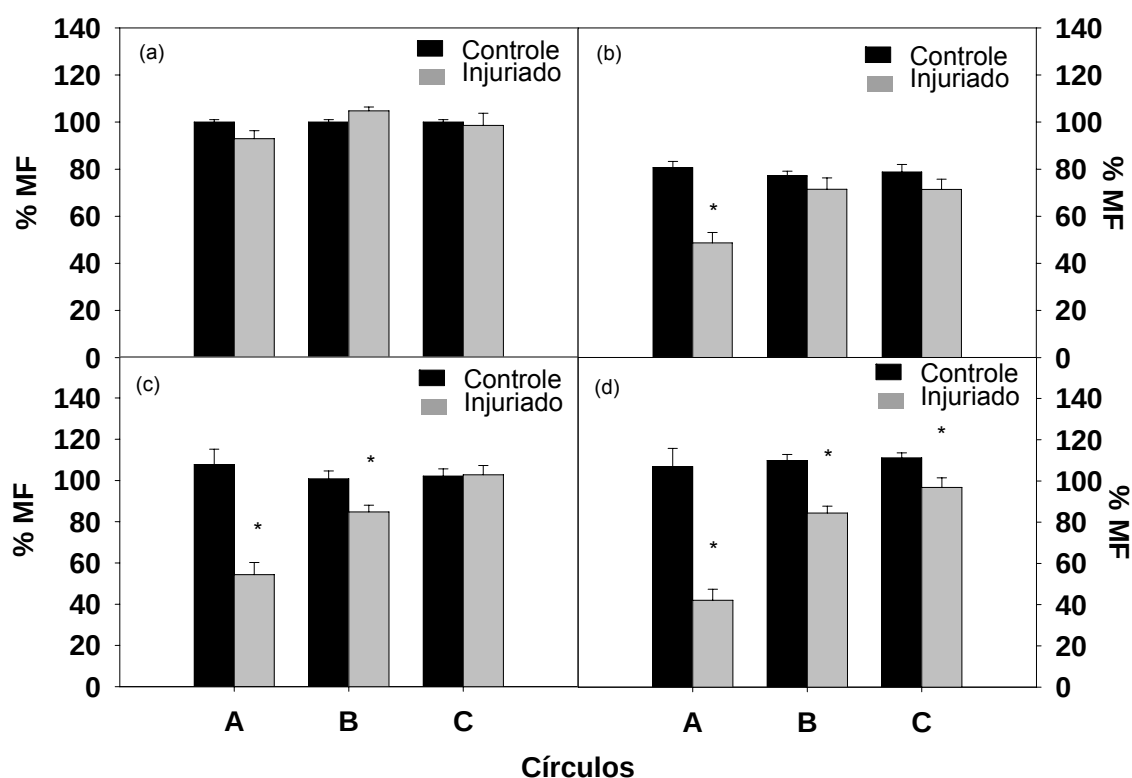


Figura 7: Porcentagem de massa de matéria fresca nos círculos A (0,6 cm de diâmetro) e nos anéis B (1,1 cm de diâmetro) e C (1,6 cm de diâmetro), controles e injuriados, após 30 minutos (a), 2 (b), 4 (c) e 6 (d) horas da realização da injúria. As barras verticais representam o erro padrão da média.

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste *t*.

Com base no teste *t* não há diferença estatística no teor de clorofila entre os círculos controle e danificados, em nenhum dos tempos avaliados (Figura 8). Com 24 horas, o círculo A danificado estava com 89 % do teor de clorofila do disco controle, o anel B com 95 e o C com 99 % (Figura 8b). Após 48 horas ocorreu redução de 5 e 11 % no teor de clorofila do círculo A e no anel B injuriados, respectivamente (Figura 8c) e 72 horas após, essa redução foi de 3 % no A e 8 % nos anéis B e C danificados (Figura 8d).

Em frutos de kiwi injuriados houve redução da cor verde em aproximadamente 70 % comparado aos frutos intactos, após 10 dias de armazenamento a 2 °C. Este decréscimo provavelmente foi ocasionado pelo aumento da degradação de clorofila (Mao et al., 2007). Em acelgas, a degradação de clorofila mais intensa foi verificada naquelas com maior extensão da injúria, apresentando redução de 80 % no teor de clorofila, após 11 dias armazenadas a 4 °C (Roura et al., 2000).

Apesar de observarmos visualmente amarelecimento no local do dano (Figura 9), verificamos que não existe uma consistente redução do teor de clorofila devido à injúria, como ocorre nas espécies acima citadas. Os discos danificados apresentaram reduções de aproximadamente 10 % no teor de clorofila comparado aos não injuriados. Esse resultado pode ser explicado devido ao amarelecimento natural que ocorre pelo fato de a folha colhida iniciar o processo de senescência, já que há uma redução no teor de clorofila dos círculos e anéis ao longo dos dias de análise.

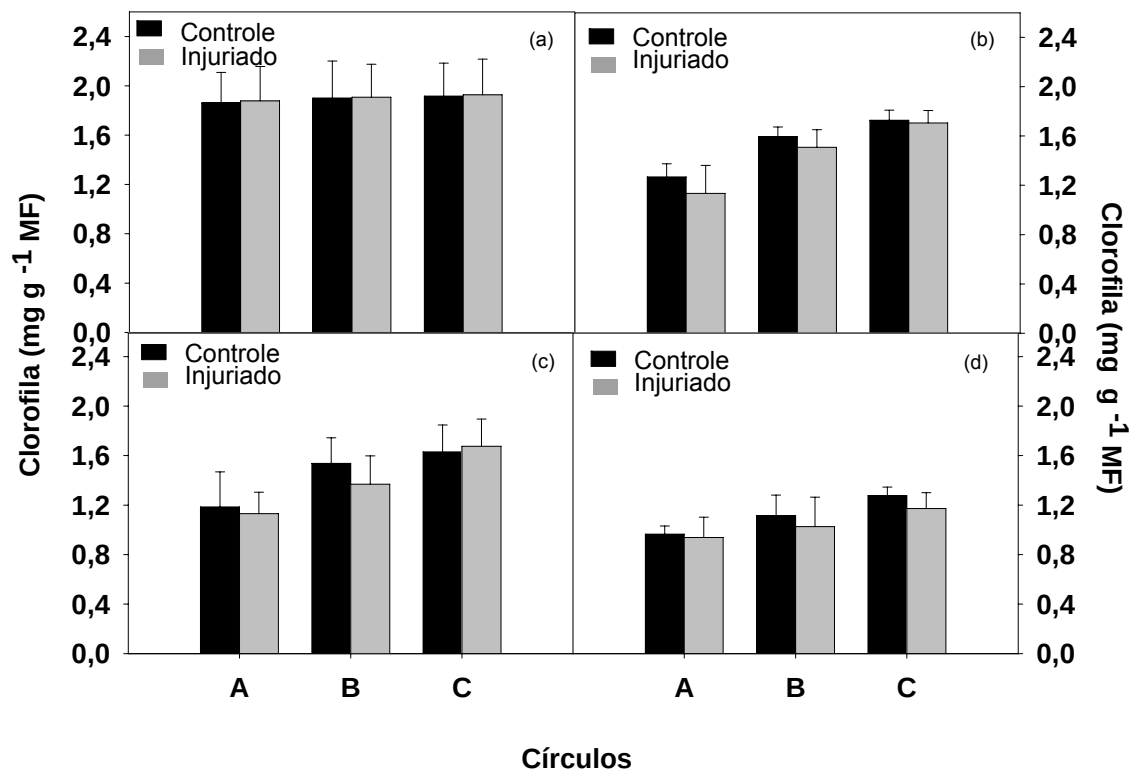


Figura 8: Teor de clorofila nos círculos A (0,6 cm de diâmetro) e nos anéis B (1,1 cm de diâmetro) e C (1,6 cm de diâmetro), controles e injuriados, após 30 minutos (a), 24 (b), 48 (c) e 72 (d) horas da realização da injúria. As barras verticais representam o erro padrão da média.



Figura 9: Sintomas de alteração de cor em folhas de taioba variedade 'Comum', 24 horas após a realização do dano.

realização do dano, ocorrendo um aumento no acúmulo de fenóis de 12 e 3% no círculo A e de 9 e 2 % no anel C com 30 minutos e 2 horas após o dano, respectivamente (Figuras 10a e 10b). A partir de 4 horas, há diferença estatística no acúmulo de fenóis, que apresentou aumento de 44% no círculo A e 32 % no anel C danificados, comparados aos controles (Figura 10c). Com 6 horas após o dano, somente o círculo A possui diferença estatística no acúmulo de compostos fenólicos (Figura 10d), que quando injuriado, apresentou um acúmulo de fenóis 50 % maior que o controle. Verifica-se também aumento de 18 % no anel B, apesar de não diferir estatisticamente do controle. Entretanto, ocorre redução do acúmulo de fenóis do anel C injuriado, chegando a valores semelhantes estatisticamente ao do seu controle.

De maneira geral, verifica-se aumento no acúmulo de fenóis iniciando 4 horas após o dano, no círculo A, que é o mais intensamente afetado, onde se realizaram os furos da agulha.

De acordo com Reyes et al. (2007), as mudanças no conteúdo de fenólicos solúveis em resposta ao dano dependem do tecido estudado. Em alface, aipo, cenoura e batata doce, há aumento na concentração de fenólicos de 81, 30, 191 e 13 %, respectivamente, após 2 dias da realização do dano. Resposta contrária é verificada em outros vegetais, como, abobrinha, rabanete e batata. O dano também induz o aumento no acúmulo de compostos fenólicos solúveis em folhas de alface injuriadas, quando comparadas ao controle, após armazenamento a 10°C durante 48 horas (Kang & Saltveit, 2007).

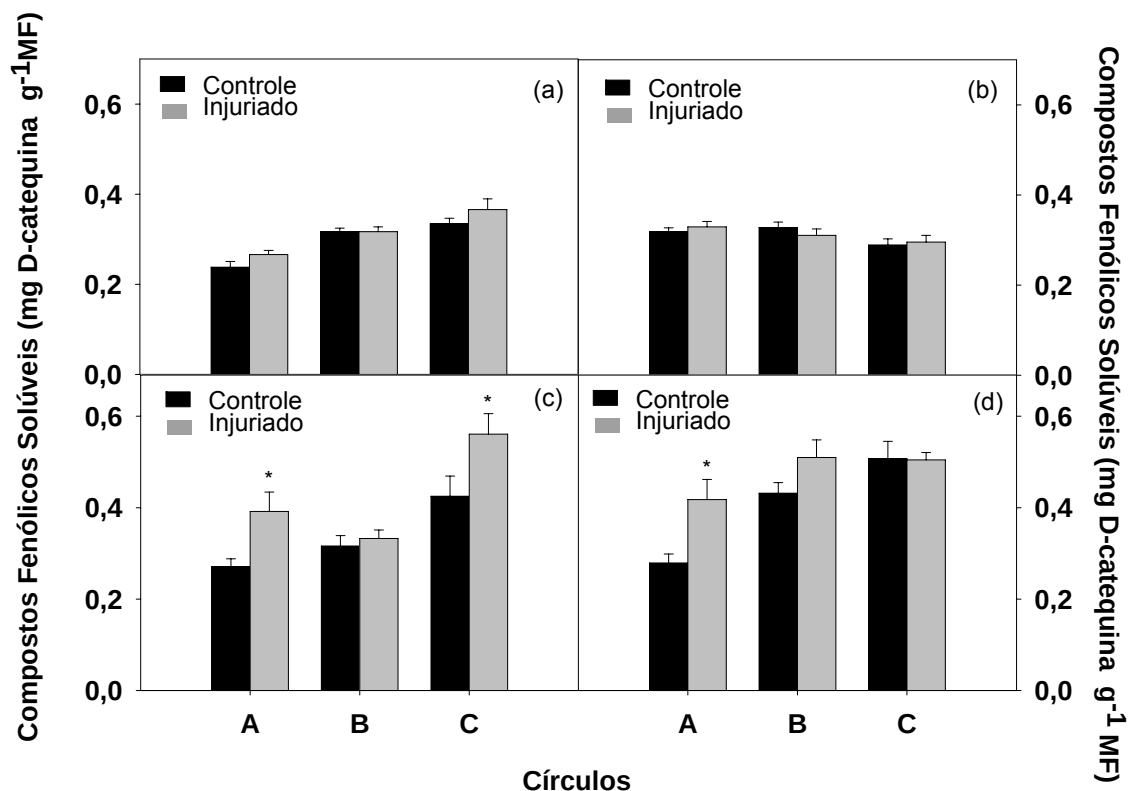


Figura 10: Acúmulo de compostos fenólicos solúveis nos círculos A (0,6 cm de diâmetro) e nos anéis B (1,1 cm de diâmetro) e C (1,6 cm de diâmetro), controles e injuriados, após 30 minutos (a), 2 (b), 4 (c) e 6 (d) horas da realização da injúria. As barras verticais representam o erro padrão da média.

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste *t*.

No momento inicial, 30 minutos após a aplicação do dano, houve indução ao aumento da atividade da enzima PAL no círculo A, que apresentou uma atividade 3,5 vezes maior que o controle (Figura 11a). A partir de 2 horas, o aumento da atividade ocorre em todos os círculos injuriados, porém, sem verificar diferença estatística entre os tratamentos (Figura 11b). A atividade enzimática aumentou 53, 13 e 34 % nos círculos A, B e C injuriados, respectivamente, em relação aos controles. Com 4 horas, o comportamento do círculo A e anel B são semelhantes ao do momento inicial e o anel C injuriado teve sua atividade 1,7 vezes maior que o controle, entretanto, sem haver diferença estatística entre os tratamentos impostos (Figura 11c). Após 6 horas, houve diferença entre o círculo A controle e danificado, com 91% de aumento na atividade da PAL quando danificado (Figura 11d). A elevada atividade da enzima corrobora com a maior concentração de compostos fenólicos no mesmo disco (Figura 10). Nos anéis B e C danificados a atividade enzimática foi 11 e 19 % maior que nos seus controles.

De acordo com Campos-Vargas & Saltveit (2002), o dano induz rápido aumento da atividade da PAL em alface, atingindo o seu máximo 8 horas após a injúria, quando armazenada a 25°C. Reyes et al. (2007) também encontraram aumento na atividade da PAL em diferentes hortaliças danificadas, como alface, cenoura e batata doce.

Esses resultados mostram que o dano em folhas de taioba induziu o metabolismo dos fenilpropanóides, aumentando a atividade da PAL, que resultou no acúmulo de compostos fenólicos solúveis.

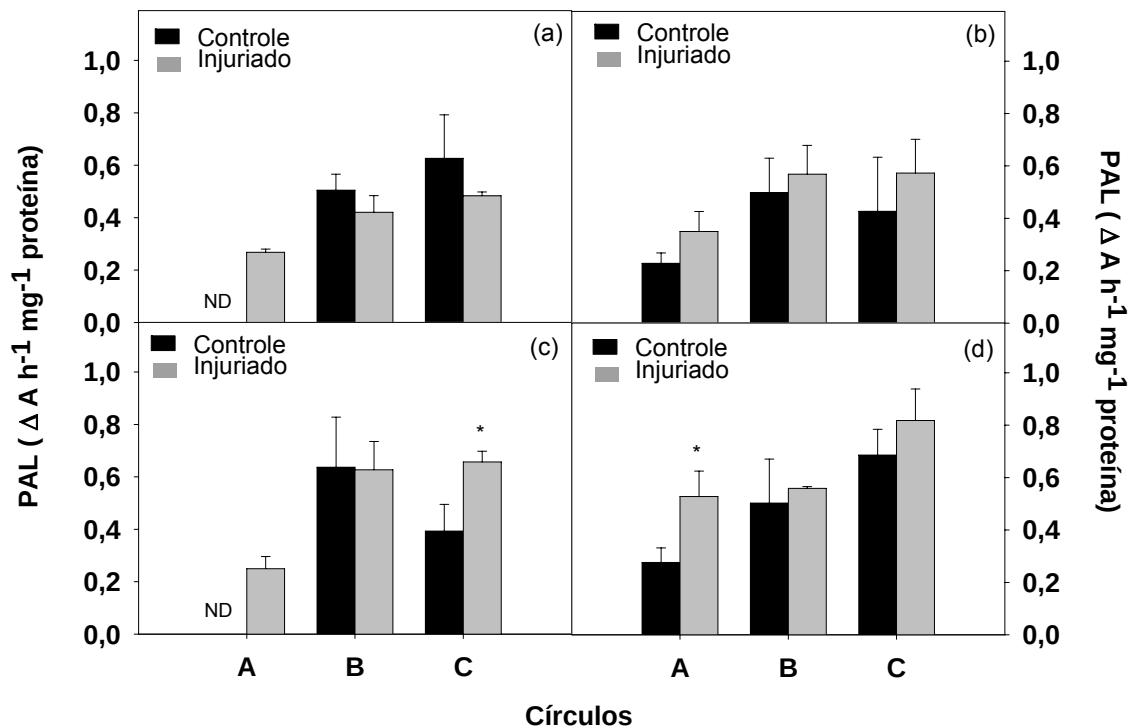


Figura 11: Atividade da enzima PAL nos círculos A (0,6 cm de diâmetro) e nos anéis B (1,1 cm de diâmetro) e C (1,6 cm de diâmetro), controles e injuriados, após 30 minutos (a), 2 (b), 4 (c) e 6 (d) horas da realização da injúria. As barras verticais representam o erro padrão da média. ND=não detectável

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste *t*.

A figura 12 mostra que não existe um efeito bem definido do dano sobre o teor de açúcares solúveis totais. Todos os círculos danificados, exceto o anel B, apresentaram níveis maiores de açúcares totais que os controles. Com 2 horas da realização da injúria, há diferença estatística no teor de açúcares totais no círculo A, que quando danificado apresentou 63 % maior teor de açúcares totais que o controle. Entretanto, o contrário ocorreu com o anel B, que, mesmo sem diferença estatística, quando não danificado, obteve teor de açúcares totais 52 % maior que o danificado (Figura 12b).

Roura et al. (2000), apesar de não verificarem diferença significativa no teor de açúcares solúveis em folhas de acelga submetidas ao dano, constataram que aquelas injuriadas apresentaram decréscimos, porém sem mostrar tendência relacionada à intensidade do dano.

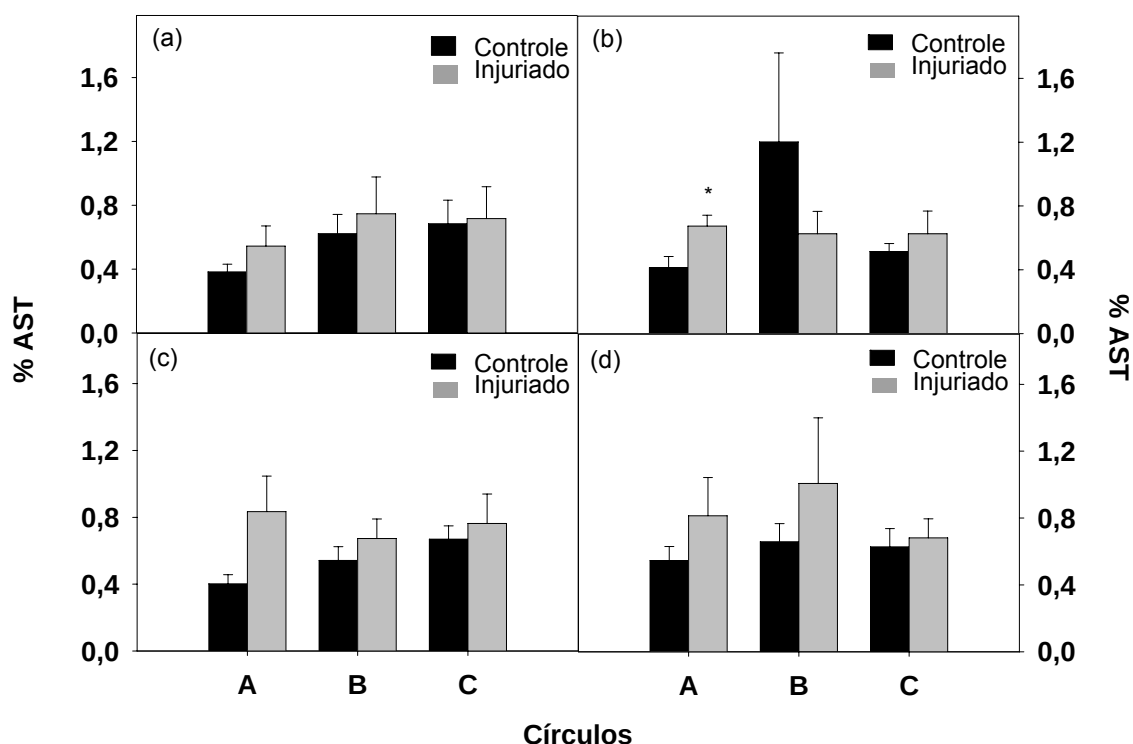


Figura 12: Teor de açúcares solúveis totais nos círculos A (0,6 cm de diâmetro) e nos anéis B (1,1 cm de diâmetro) e C (1,6 cm de diâmetro), controles e injuriados, após 30 minutos (a), 2 (b), 4 (c) e 6 (d) horas da realização da injúria. As barras verticais representam o erro padrão da média.

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste *t*.

Comportamento semelhante aos açúcares totais ocorreu com o teor de açúcares não redutores (Figura 13). O círculo A controle apresentou estatisticamente menor teor de açúcares não redutores após 30 minutos e 2 horas (Figuras 13a, 13b), porém, a partir de 4 horas, os valores entre os tratamentos são semelhantes estatisticamente (Figuras 13c, 13d). Os círculos A danificados apresentaram valores 112, 283, 68 e 30 % maiores que os controles, com 30 minutos, 2, 4 e 6 horas após o dano. Essa redução na diferença do teor de açúcares não redutores ao longo do tempo avaliado pode refletir o início da senescência no círculo A injuriado, que pode ser resultado do efeito do dano ou do envelhecimento natural de um disco foliar.

A injúria não induziu a alterações consistentes no teor de açúcares redutores 30 minutos após sua realização (Figura 14a). Há aumento de 4 e 24% no teor de açúcares redutores 2 horas após o dano, no círculo A e anel C injuriados, respectivamente, em relação aos controles (Figura 14b). A partir de 4 horas verificamos aumento no teor de açúcares redutores em todos os círculos danificados, entretanto, maiores aumentos são verificados no círculo A danificado, que com 4 e 6 horas tinham 79 e 146 % mais açúcares redutores que o disco controle, apresentando diferença significativa após 6 horas da realização da injúria (Figuras 14c, 14d).

Com isso, sugere-se que o maior consumo de reservas ocorre no círculo diretamente injuriado, o círculo A, onde também foi verificado uma maior taxa respiratória.

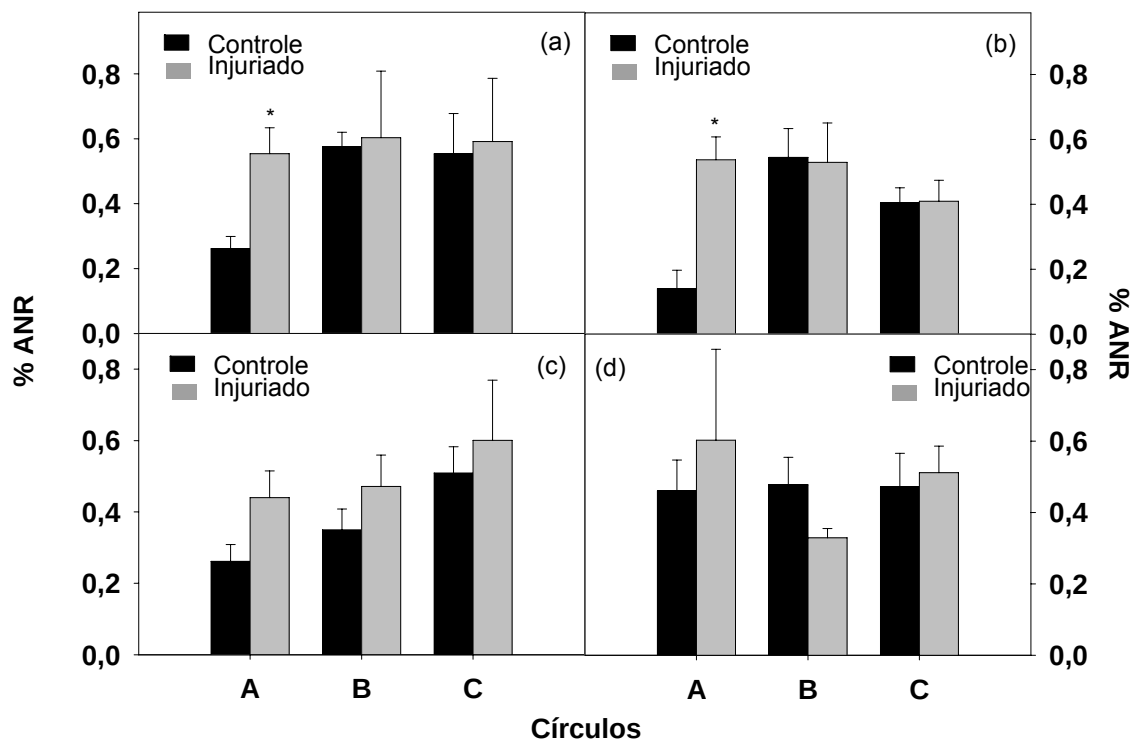


Figura 13: Teor de açúcares não redutores nos círculos A (0,6 cm de diâmetro) e nos anéis B (1,1 cm de diâmetro) e C (1,6 cm de diâmetro), controles e injuriados, após 30 minutos (a), 2 (b), 4 (c) e 6 (d) horas da realização da injúria. As barras verticais representam o erro padrão da média.

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste *t*.

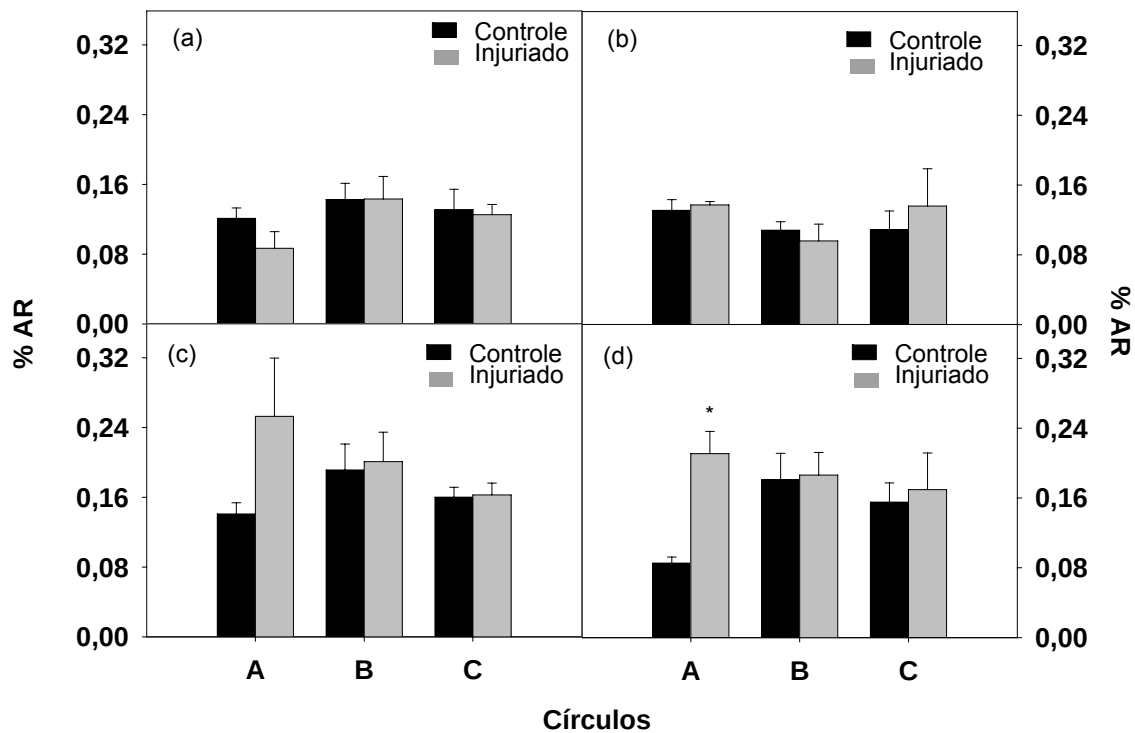


Figura 14: Teor de açúcares redutores nos círculos A (0,6 cm de diâmetro) e nos anéis B (1,1 cm de diâmetro) e C (1,6 cm de diâmetro), controles e injuriados, após 30 minutos (a), 2 (b), 4 (c) e 6 (d) horas da realização da injúria. As barras verticais representam o erro padrão da média.

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste *t*.

O teor de amido foi 33 e 75 % maior significativamente no círculo A injuriado após 2 e 4 horas, respectivamente, quando comparados ao controle (Figuras 15b, 15c) e, 6 horas após a injúria, o teor de amido é 10 % maior no círculo A controle. O anel B danificado obteve níveis de amido menores do que no controle, durante todo o experimento. Já o anel C danificado não demonstrou resposta consistente ao dano, apesar de ser diferente significativamente do controle 2 horas após a injúria. No entanto, há uma redução nos teores de amido em todos os tamanhos de discos danificados, 6 horas após a realização da injúria.

Em abobrinhas submetidas ao dano, ocorreu redução no teor de amido, porém sem diferença significativa quando comparada aos frutos intactos (Durigan & Mattiuz, 2007).

Considerando esses resultados, podemos concluir que em folhas de taioba danificadas, apesar de haver consumo de reservas no local do dano, evidenciadas pelo aumento do teor de açúcares redutores, não se observa o esgotamento dessas reservas, mostradas pelos elevados teores de açúcares totais, não redutores e amido.

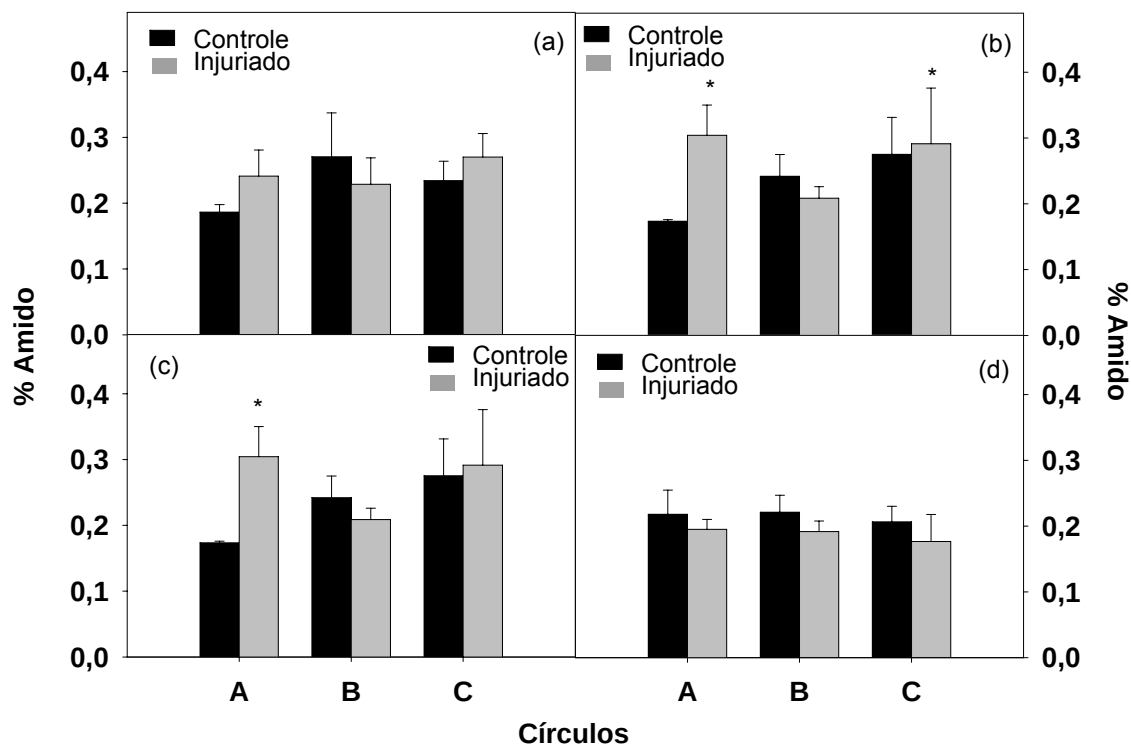


Figura 15: Teor de amido nos círculos A (0,6 cm de diâmetro) e nos anéis B (1,1 cm de diâmetro) e C (1,6 cm de diâmetro), controles e injuriados, após 30 minutos (a), 2 (b), 4 (c) e 6 (d) horas da realização da injúria. As barras verticais representam o erro padrão da média.

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste *t*.

4. CONCLUSÕES

O dano mecânico em folhas de taioba causa aumento da produção de etileno no anel B danificado. A baixa produção de etileno pelo círculo A, no local da injúria, 4 horas após o dano, ocorre pela falta de seu substrato, ACC.

Outras respostas decorrentes da injúria são o aumento da produção de CO₂, redução da massa de matéria fresca e indução ao metabolismo dos fenilpropanóides (evidenciada pelo aumento da atividade da enzima PAL e pelo acúmulo de compostos fenólicos solúveis) no círculo A, mostrando que o dano induz a alterações fisiológicas no local onde foi realizado, não existindo sinalização secundária.

Não há esgotamento de carboidratos na região da injúria, evidenciado pelo elevado teor de açúcares solúveis totais, não redutores e amido e o teor de clorofila não é afetado pela mesma.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, F.B; MORGAN, P.W; SALTVEIT, M.E. **Ethylene in Plant Biology**. 2nd ed. Academic Press, San Diego, 414 p. 1992.

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, p. 1-15. 1949.

BHOWMIK, P.K; MATSUI, T. Ethylene biosynthetic genes in 'Moso' bamboo shoot in response to wounding. **Postharvest Biology and Technology**, v. 38, p. 188-194. 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analitic Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMPOS-VARGAS, R; SALTVEIT, M.E. Involvement of putative chemical wound signals in the induction of phenolic metabolism in wounded lettuce. **Physiologia Plantarum**, v. 114, p. 73-84, 2002.

CANTWELL, M.I; SUSLOW, T.V. Postharvest handling systems: fresh-cut fruits and vegetables. In: KADER, A.A. (ed.) **Postharvest Technology of Horticultural Crops**. 3rd ed. University of California, 535p. 2002.

DELLA-JUSTINA, M.E.; FINGER, F.L.; PUIATTI, M. Perda pós-colheita da matéria fresca e da água em quiabo influenciada pelo tamanho do fruto e dano mecânico. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 23, p. 37-40. 1998.

DRUEGE, U. Ethylene and plant responses to abiotic stress. NAFEES, A.K. (Ed.). **Ethylene action in plants**. Department of Botany, Aligarh Muslim University, 206p. 2006.

DUBOIS, M; GILLES, K.A; HAMILTON, J.K; REBERS, P.A; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p.350-356, 1956.

DURIGAN, M.F.B; MATTIUZ, B. Efeito de injúrias mecânicas na qualidade de abobrinhas armazenadas em condição ambiente. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 291-295, 2007.

ESCALONA, V.H; AGUAYO, E; ARTÉS, F. Metabolic activity and quality changes of whole and fresh-cut kohlrabi (*Brassica oleracea* L. *gongylodes* group) stored under controlled atmospheres. **Postharvest Biology and Technology**, v. 41, p. 181-190, 2006.

HENZ, G.P.; SOUZA, R.M.; PEIXOTO, J.R.; BLUMER, L. Danos causados pelo impacto de queda na qualidade pós-colheita de raízes de mandioquinha-salsa. **Horticultura Brasileira**, v. 23, p. 881-886. 2005.

HRAZDINA, G.; JENSEN, R.A. Spatial organization of enzymes in plant metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 241-267. 1992.

JACOMINO, A.P.; MENDONÇA, K. ; KLUGE, R.A. Armazenamento refrigerado de limões 'Siciliano' tratados com etileno. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, p. 45-48. 2003.

JIANG, Y; JOYCE, D.C. ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. **Plant Growth Regulation**, v. 39, p. 171-174, 2003.

KADER, A.A. **Postharvest Technology of Horticultural Crops**. 3rd ed. University of California, 535 p. 2002.

KANG, H; SALTVEIT, M.E. Wound-induced increases in phenolic content of fresh-cut lettuce is reduced by a short immersion in aqueous hypertonic solutions. **Postharvest Biology and Technology**, v.29, p.271-277, 2003.

McCREADY, R.M., GUGGOLZ, J., SILVIERA,V., OWENS, H.S. Determination of starch and amylose in vegetables. **Analytic Chemistry**, v. 22, p. 1156-1158, 1950.

MACNICOL, P.K. Rapid metabolic changes in the wounding response of leaf discs following excision. **Plant Physiology**, v. 57, p. 80-84, 1976.

MANGAN, F.X; MENDONÇA, R.U; MOREIRA, M; NUNES, S.V; FINGER, F.L; BARROS, Z.J; GALVÃO, H; ALMEIDA, G.C; SILVA, R.A.N; ANDERSON, M.D. Production and marketing of vegetables for the ethnic markets in the United States. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 6-14, 2008.

MAO, L; WANG, G; QUE, F. Application of 1-methylcyclopropene prior to cutting reduces wound responses and maintains quality in cut kiwifruit. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 361-365, 2007.

MOURA, M.L; FINGER, F.L; MIZOBUTSI, G.P; GALVÃO, H.L. Fisiologia do amadurecimento na planta do tomate 'Santa Clara' e do mutante 'Firme'. **Horticultura Brasileira**, v. 23, p. 81-85, 2005.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

PINTO, N.A.V.D; VILAS BOAS, V.M; CARVALHO, V.D. Caracterização mineral das folhas de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* Schott). **Ciência e Agrotecnologia** (Lavras), v. 23, p. 57-61, 1999.

PINTO, N.A.V.D; FERNANDES, S.M; THÉ, P.M.P; CARVALHO, V.D. Variabilidade da composição centesimal, vitamina C, ferro e cálcio de partes da folha de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* Schott). **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 7, p. 205-208, 2001.

PRINCE, M.L; BUTLER, L.G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, p. 1268-1273, 1977.

REYES, L.F; VILLARREAL, J.E; CISNEROS-ZEVALLOS, L. The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetables tissue. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1254-1262, 2007.

ROURA, S.I; DAVIDOVICH, L.A; DEL VALLE, C.E. Quality loss in minimally processed swiss chard related to amount of damaged area. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 33, p. 53-59, 2000.

SANTOS, R.H.S.; SILVA, F.; CASALI, V.W.D.; CONDÉ, A.R. Conservação pós-colheita de alface cultivada com composto orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 521-525. 2001.

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

SALTVEIT, M.E. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. **Postharvest Biology and Technology**, v. 21, p. 61-69. 2000.

SALTVEIT, M.E; OCHOA, O; CAMPOS-VARGAS, R; MICHELMORE, R. Lines of lettuce selected for ethylene insensitivity at the seedling stage displayed variable responses to ethylene or wounding as mature heads. **Postharvest Biology and Technology**, v.27, p. 277-283, 2003.

SALTVEIT, M.E. Respiratory metabolism. In: GROSS, C.K; WANG, C.Y; SALTVEIT, M.E. (Eds.). **The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks**. Agriculture Handbook Number 66, USDA, University of California. 2004.

SEGANFREDO, R; FINGER, F.L; BARROS, R.S; MOSQUIM, P.R. Influência do momento de colheita sobre a deterioração pós-colheita em folhas de taioba. **Horticultura Brasileira**, v. 19, p. 184-187, 2001.

SERRANO, M; MARTÍNEZ-ROMERO, D; CASTILLO, S; GUILLÉN, F; VALERO, D. Role of calcium and heat treatments in alleviating physiological changes induced by mechanical damage in plum. **Postharvest Biology and Technology**, v. 34, p. 155-167, 2004.

SIMÕES, A.N. **Alterações químicas e atividades de enzimas em folhas de couve inteiras e minimamente processadas**. Tese de Mestrado em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Viçosa Viçosa, 86 p, 2004.

SIOMOS, A.S.; GERASOPOULOS,D.; TSOUVALTZIS, P.; KOUKOUNARAS, A. Peeling has no effect on respiration and ethylene production and only minimal effect on quality of fresh white asparagus spears. **Postharvest Biology and Technology**, v. 50, p. 224-227, 2008.

SLESACK, I.; SLESACK, H.; LIBIK, M.; MISZALSKI, Z. Antioxidant response system in the short-term post-wounding effect in *Mesembryanthemum crystallinum* leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.165, p. 127-137, 2008.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. SANTARÉM, E. R. *et al.* 3ª Ed. Porto alegre: Artmed, 719p. 2004.

TATSUKI, M.; MORI, H. Rapid and transient expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase isogenes by touch and wound stimuli in tomato. **Plant & Cell Physiology**, v. 40, p. 709-715. 1999.

TOIVONEN, P.M.A.; BRUMMELL, D.A. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 1-14. 2008.

TSOUVALTZIS, P; GERASOPOULOS, D; SIOMOS, A.S. Effects of base removal and heat treatment on visual and nutritional quality of minimally processed leeks. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, p. 158-164, 2007.

WHITEHEAD, C.S; HALEVY, A.H; REID, M.S. Control of ethylene synthesis during development and senescence of carnation petals. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 109, p. 473-475, 1984.