

LUCIANA MARQUES VIEIRA

**INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO NA LONGEVIDADE PÓS-COLHEITA DE
INFLORESCÊNCIAS DE *Epidendrum ibaguense* Kunth**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

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

T

V658i
2013

Vieira, Luciana Marques, 1979-
Influência do óxido nítrico na longevidade pós-colheita
de inflorescências de *Epidendrum ibaguense* Kunth / Luciana
Marques Vieira. – Viçosa, MG, 2013.
x, 74 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Fernando Luiz Finger.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Epidendrum ibaguense* - Conservação. 2. Óxido nítrico.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.
II. Título.

CDD 22. ed. 635.93415

LUCIANA MARQUES VIEIRA

**INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO NA LONGEVIDADE PÓS-COLHEITA DE
INFLORESCÊNCIAS DE *Epidendrum ibaguense* Kunth**

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

APROVADA: 27 de março de 2013.

Ana Maria Mapeli

José Geraldo Barbosa

Tânia Pires da Silva

Wagner Campos Otoni

Fernando Luiz Finger
(Orientador)

A Deus.

A Pedro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho.

À minha família, pelo apoio em todos os momentos, especialmente à minha mãe, pelo incentivo em chegar até aqui; a Reinaldo, pelo companheirismo; e a Pedro, que é a minha vida.

Ao meu professor e orientador, Fernando Luiz Finger, pela paciência, pelos valiosos ensinamentos e pela orientação durante muitos anos.

À Universidade Federal de Viçosa, principalmente aos professores e funcionários do curso de Fisiologia Vegetal, pelo profissionalismo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores José Geraldo Barbosa e Wagner Campos Otoni, pelas sugestões e ensinamentos.

Aos técnicos do Laboratório de Pós-Colheita, Geraldo e Sebastião, pelo auxílio durante toda a pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Pós-Colheita, pela convivência e pelos momentos de descontração.

À Ariana Mota Pereira, estagiária do Laboratório de Pós-Colheita, pelo valioso auxílio durante as análises.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

LUCIANA MARQUES VIEIRA, filha de José de Arimathéa Silveira Marques e Terezinha de Castro Fontes, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 21 de março de 1979.

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

Em outubro de 2006, iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 15 de julho de 2008.

Em agosto de 2008, iniciou o curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 27 de março de 2013.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências bibliográficas	5
CAPÍTULO 1 - EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NA LONGEVIDADE DE INFLORESCÊNCIAS DE <i>Epidendrum ibaguense</i> Kunth	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1. Experimento I: efeito da solução de nitroprussiato de sódio em vaso na forma de 'pulsing'	12
2.2. Experimento II: efeito da solução de nitroprussiato de sódio fornecida via pulverização	12
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
3.1. Experimento I: efeito da solução de nitroprussiato de sódio em vaso na forma de 'pulsing'	13
3.2. Experimento II: efeito da solução de SNP fornecida via pulverização ...	20
4. CONCLUSÕES	26
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO 2 - RESPOSTAS ANTIOXIDATIVAS DE FLORES DE <i>Epidendrum ibaguense</i> TRATADAS COM SOLUÇÃO CONTENDO ALTA CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	29
1. INTRODUÇÃO	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1. Obtenção do extrato enzimático bruto e determinação das atividades das enzimas SOD, CAT, POD e APX	32
2.1.1. Determinação da atividade da SOD (EC 1.15.1.1)	33
2.1.2. Determinação da atividade da CAT (EC 1.11.1.6)	33
2.1.3. Determinação da atividade da POD (EC 1.11.1.7)	34
2.1.3. Determinação da atividade da APX (EC 1.11.1.11)	34
2.1.4. Determinação da atividade da enzima PPO (EC 1.10.3.1)	34
2.2. Análise quantitativa das proteínas	35
2.3. Análise estatística	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1. Experimento I: inflorescências tratadas com SNP em solução de condicionamento	35

3.2. Experimento II: inflorescências pulverizadas com solução de SNP	42
4. CONCLUSÕES	48
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
CAPÍTULO 3 - ATIVIDADE DA FENILALANINA AMÔNIA LIASE, ACÚMULO DE COMPOSTOS FENÓLICOS SOLÚVEIS E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM INFLORESCÊNCIAS DE <i>Epidendrum ibaguense</i> TRATADAS COM SNP	
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1. Determinação da atividade da PAL (EC 4.3.1.5)	57
2.2. Determinação do teor de compostos fenólicos solúveis	57
2.3. Determinação do extravasamento de eletrólitos	58
2.4. Determinação da concentração de MDA-TBA	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1. Experimento I: inflorescências tratadas com SNP em solução de condicionamento	59
3.2. Experimento II: inflorescências pulverizadas com solução de SNP	64
4. CONCLUSÕES	69
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
CONCLUSÕES GERAIS	74

RESUMO

VIEIRA, Luciana Marques, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Influência do óxido nítrico na longevidade pós-colheita de inflorescências de *Epidendrum ibaguense* Kunth.** Orientador: Fernando Luiz Finger.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito do nitroprussiato de sódio (SNP) sobre a longevidade pós-colheita de inflorescências de *Epidendrum ibaguense* Kunth e a sua ação no sistema antioxidativo. No primeiro capítulo, as inflorescências foram tratadas com solução contendo 5, 10, 50, 100 e 500 μM de SNP, via solução de condicionamento (“pulsing”) ou pulverização, com os respectivos controles em água. No segundo e terceiro capítulos, as inflorescências foram tratadas com 500 μM de SNP via solução de condicionamento ou pulverização, com os respectivos controles em água. Não foram observadas diferenças sobre a longevidade das inflorescências quando tratadas com solução de SNP até a concentração 100 μM , independente do modo de aplicação. Inflorescências tratadas com 500 μM de SNP em solução de condicionamento tiveram aumento na abscisão de flores e apresentaram sintomas de toxidez, como o escurecimento do labelo, resultando na redução da longevidade de 5 para 2 dias. A longevidade das inflorescências pulverizadas com 500 μM de SNP reduziu de 6,8 para 5,1 dias. Verificou-se inibição de 47%, comparado ao controle, para a atividade da SOD em flores tratadas com 500 μM de SNP em solução de condicionamento 48 após o tratamento. Nas inflorescências pulverizadas com SNP houve inibição da atividade da peroxidase (POD). A atividade das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e polifenol oxidase (PPO) não foram alteradas, independente do modo de aplicação. Ocorreu aumento para a atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) em flores tratadas com 500 μM de SNP em solução de condicionamento e, flores pulverizadas com SNP, apresentaram maior atividade, comparado ao controle, 96 horas após o tratamento. O teor de fenóis não diferiu nas flores mantidas em água ou solução de SNP, entretanto foi superior nas flores pulverizadas com solução de SNP, comparado ao

controle, 48 horas após o tratamento. O extravasamento de eletrólitos não diferiu entre os tratamentos exceto nas inflorescências pulverizadas com SNP que apresentaram aumento de 4% em relação ao controle pulverizado com água ao final do período avaliado. A peroxidação lipídica, estimada pela produção de aldeído malônico (MDA-TBA), não foi alterada nas flores mantidas em solução de condicionamento contendo SNP, comparado ao controle mantido em água. Foi observado aumento de 127% no teor de MDA-TBA em inflorescências pulverizadas com solução contendo 500 μ M de SNP, 72 horas após o tratamento. Dessa forma, o óxido nítrico causou efeito deletério em flores de *E. ibaguense*, inibindo a atividade de enzimas do sistema antioxidativo e promovendo a peroxidação lipídica.

ABSTRACT

VIEIRA, Luciana Marques, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2013. **Influence of nitric oxide in the postharvest longevity of inflorescences of *Epidendrum ibaguense* Kunth.** Adviser: Fernando Luiz Finger.

This work aimed to evaluate the effects of sodium nitroprusside (SNP) on postharvest longevity of inflorescences of *Epidendrum ibaguense* Kunth and its action on the antioxidative system. In the first chapter, the inflorescences were treated with a solution containing 5, 10, 50, 100 e 500 μM SNP by pulsing or by spraying with control in water. In the second and third chapters, the inflorescences were treated with 500 μM SNP by pulsing or by spraying with control in water. There were no differences in the longevity of the flowers treated with SNP solution to the concentrations of 100 μM , regardless of the mode of application. Inflorescences treated with 500 μM SNP by pulsing had increased abscission of flowers and showed toxicity symptoms such as labellum darkening, resulting in reduction of longevity from 5 to 2 days. The longevity of inflorescences sprayed with 500 μM SNP reduced from 6.8 to 5.1 days. There was inhibition of 47% compared to control, for superoxide dismutase (SOD) activity in flowers pulsed with 500 μM SNP, 48 hours after treatment. In flowers sprayed with SNP we observed inhibition of peroxidase (POD) activity. Catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and polyphenol oxidase (PPO) activities did not change, regardless of the mode of application. It was observed increased of phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity in flowers pulsed with 500 μM SNP solution. However, flowers sprayed with SNP showed higher activity compared to control, 96 hours after treatment. The phenol content was not different in flowers kept in water or solution of SNP however, was higher in flowers sprayed with 500 μM SNP, compared to control, 48 hours after treatment. The electrolyte leakage did not differ among treatments, except in inflorescences sprayed with SNP which showed an increase of 4%, compared to control sprayed with water at the end of the study period. Lipid peroxidation, estimated by production malondialdehyde (MDA), was not changed in flowers

kept in SNP solution, compared with the control kept in water. TBA-MDA content increased by 127% in inflorescences sprayed with 500 μ M SNP, 72 hours after treatment. Thus, nitric oxide caused deleterious effect on *E. ibaguense* flowers, inhibiting the activity of enzymes of the antioxidative system and promoting lipid peroxidation.

INTRODUÇÃO GERAL

A floricultura brasileira vem adquirindo notável desenvolvimento nos últimos anos e se caracteriza como um dos mais promissores segmentos da horticultura no campo do agronegócio nacional (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008). Segundo o Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (Sebrae), a comercialização de flores e plantas ornamentais, no Brasil, vem registrando crescimento entre 12% ao ano, bem acima da média da economia nacional. O Instituto Brasileiro de Floricultura (Ibraflor) divulgou uma análise do mercado de flores no Brasil mostrando que o setor emprega, atualmente, 194 mil pessoas (MACIEL, 2012).

Dentre as espécies ornamentais com potencial para flores de corte está o *Epidendrum ibaguense* Kunth (Orchidaceae), que se adapta plenamente ao cultivo a pleno sol, florescendo praticamente durante todo o ano (MAPELI et al., 2009a). É encontrada, naturalmente, no Brasil desde o Amapá até Minas Gerais, sendo facilmente propagada (FINGER et al., 2008) por estaquia. A espécie tem potencial para flor de corte, por produzir hastes com caule longo e inflorescência de rara beleza com coloração amarelo-alaranjada. Todavia, é considerada altamente sensível ao etileno, o qual promove aumento na taxa de abscisão e senescência prematura das flores (MORAES et al., 2007). A curta longevidade dessa inflorescência, que pode ser inferior a seis dias em condições de temperatura ambiente, limita a comercialização (FINGER et al., 2008).

Em virtude das propriedades fisiológicas, muitos frutos, vegetais e flores são considerados altamente perecíveis e, por isso, técnicas pós-colheita são desenvolvidas visando manter a qualidade dos produtos durante o armazenamento (PALIYATH et al., 2008). Dentre essas técnicas, inclui-se a adição de compostos químicos na água de vaso. A maioria das soluções preservativas utilizadas em flores de corte contém carboidratos, germicidas e inibidores da síntese ou ação do etileno, como aminoetoxivinilglicina (AVG), ácido aminooxiacético (AOA), ácido acetilsalicílico (AAS), tiosulfato de prata (STS) e 1-metilciclopropeno (1-MCP) (MORAES et al., 2007; MAPELI et al., 2009a). Inúmeras soluções de vaso são recomendadas, porém, a eficácia

dessas soluções em estender a longevidade varia de acordo com a espécie (FINGER et al., 2008).

A curta exposição de frutos, hortaliças e flores às baixas concentrações de compostos doadores de óxido nítrico (NO), como nitroprussiato de sódio (SNP) e 2,2'-(hidroxinitrosohidrazino)-bisetanamina (DETA/NO), estendeu a vida pós-colheita (YANG et al., 2010; BOWYER; WILLS, 2003; DUAN et al., 2007; WILLS et al., 2000; SINGH et al., 2009). Em flores de corte, o NO foi testado visando estender a vida de vaso como alternativa ao 1-MCP e ao STS, um metal pesado (BADIYAN et al., 2004).

O NO, componente endógeno no metabolismo da célula vegetal, é considerado um radical livre pelo fato de ter um elétron não compartilhado em seu orbital e moderadamente solúvel em água ($0,047 \text{ cm}^3 \text{ cm}^{-3} \text{ H}_2\text{O}$; 20°C 1 atm). É capaz de se mover por difusão em partes aquosas da célula e através da fase lipídica das membranas (NEILL et al., 2003) a uma taxa de $50 \mu\text{m}$ por segundo (CORPAS et al., 2010).

Em plantas, o NO é gerado pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS), nitrato redutase (NR) ou nitrito:NO (Ni-Nor) ou por via não enzimática, por meio da conversão do nitrito a NO e nitrato, em altos valores de pH (HAYAT et al., 2010). Em baixas concentrações (menor que $1 \mu\text{mol L}^{-1}$), o NO tem meia-vida de minutos a horas, podendo se difundir em várias camadas de células ou a longas distâncias em espaços celulares. Em altas concentrações, o NO apresenta meia-vida relativamente curta, na ordem de segundos (PROCHÁZKOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011).

A importância do NO em estudos científicos se deu a partir de 1992 quando foi eleito “Molécula do ano” pela revista Science e, desde então, têm-se observado inúmeros estudos buscando elucidar seu papel em plantas (NEILL et al., 2003). É uma molécula simples que, bioquimicamente, mostra-se bastante complexa, ainda existindo uma variedade de características não compreendidas. Surgiu como importante molécula sinalizadora e, hoje, é considerada uma molécula multifuncional (HAYAT et al., 2010). Sabe-se que o NO está envolvido em muitos processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares durante o crescimento, desenvolvimento e senescência (DEL RIO et al., 2004).

O NO exerce, possivelmente, o papel de proteção da célula contra o estresse oxidativo (YIN et al., 2012). Adicionalmente, o mecanismo pelo qual o NO pode retardar a senescência pode ser também relacionado com a capacidade dessa molécula de interromper as reações em cadeia que levam à peroxidação lipídica, à preservação de pigmentos fotossintéticos por um efeito direto e positivo na biossíntese de clorofila e à modificação da atividade de proteínas (PROCHÁZKOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011). Adicionalmente, o NO inibe a expressão de genes envolvidos na rota biossintética do etileno (MANJUNATHA et al., 2012).

A capacidade do NO em exercer a função de proteção da célula contra o estresse oxidativo está relacionada aos fatores como a reação com radicais lipídicos, à eliminação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), que é tóxico para as plantas, e à ativação de enzimas do sistema antioxidativo como dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD) (HAYAT et al., 2010). Tais enzimas são ativadas durante a fase de senescência para reduzir as ROS como ânion superóxido, radicais hidroxil (OH^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto (O_2), naturalmente formadas, e que podem causar danos e morte celular (FERRANTE; FRANCINI, 2006). Em raízes de batata-doce, 0,5 mM SNP promoveu ativação das enzimas SOD, CAT, fenilalanina amônia liase (PAL), ascorbato peroxidase (APX) e glutathiona redutase (GR) e foi eficaz na cicatrização de danos provocados durante a colheita (YIN et al., 2012).

Os sistemas de defesa enzimático e não-enzimático, ativados durante a senescência, podem ser afetados negativamente pelo etileno, inibindo o processo de detoxificação e acelerando a senescência. Sabe-se que, em flores sensíveis ao etileno, como a orquídea *E. ibaguense*, a senescência é acompanhada pelo aumento na produção desse hormônio e na taxa respiratória (ARORA, 2008). Ainda, em órgãos imaturos de frutos, hortaliças e flores existe uma relação estequiométrica entre a produção de etileno e de NO durante o período de estresse, e o nível endógeno de NO, emitido por esses órgãos, variando em função da maturidade (LESHEM et al., 1998).

O NO é uma molécula bioativa que pode regular a produção de etileno por meio da inibição estequiométrica direta ou inibindo enzimas que atuam na biossíntese desse hormônio (MANJUNATHA et al., 2012). Essa molécula tem a

capacidade de se ligar à ACC oxidase resultando na formação do complexo ACC oxidase-NO, o qual forma um complexo estável ACC-ACC oxidase-NO que bioquimicamente reduz a produção de etileno. O NO inibiu a produção de etileno em frutos de kiwi tratados com $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ NO e reduziu o conteúdo de sólidos solúveis e aldeído malônico (MDA) (ZHU et al., 2010). Também, a produção de etileno foi inibida por NO em frutos de tomate, retardando o amadurecimento (LAI et al., 2011).

Em flores de cravo, observou-se aumento na vida de vaso em mais de quatro dias quando estas foram tratadas com NO (CHANG-LI et al., 2011). Em brotos de bambu, o SNP estendeu a vida pós-colheita e promoveu manutenção da qualidade (YANG et al., 2010). Nesse caso, o SNP inibiu o escurecimento e a lignificação dos brotos durante o armazenamento e a manutenção da qualidade foi relacionada com a inibição da atividade das enzimas PAL, POD e polifenol oxidase (PPO), e redução da biossíntese de etileno. Por outro lado, o excesso de NO no tecido pode resultar em morte celular (ROMERO-PUERTAS et al., 2004), sendo importante o equilíbrio entre esse composto e as ROS (NEILL et al., 2003). O efeito do NO na célula é dependente da concentração sendo que, baixas concentrações (nanomolar) são requeridas para processos regulatórios e altas concentrações (micromolar) podem provocar múltiplos danos aos diferentes componentes celulares incluindo proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (CORPAS et al., 2010).

Estudos com NO em plantas tem sido feitos utilizando-se soluções líquidas fornecidas na forma de 'pulsing' contendo um doador de NO que forma o composto após a passagem na célula (NEILL et al., 2003; ARORA, 2008). A aplicação do NO gasoso em produtos hortícolas requer infraestrutura nem sempre disponível, portanto, menos adequado que os compostos doadores (ARORA, 2008). Os doadores de NO mais recentemente utilizados em estudos com plantas são o SNP, DETA/NO, N-tert- α -fenilnitrona (PBN), 3-morfolino-sidonimina (SIN-1) e S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), sendo o primeiro mais utilizado em trabalhos de pós-colheita.

O SNP é um composto químico de fórmula $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ que serve como fonte de óxido nítrico. A solução de SNP é sensível à luz, quebrando-se na luz solar, e a decomposição é acelerada pelo oxigênio produzindo cianeto, que é tóxico. Além disso, pode haver ainda a produção de

peroxinitrito e peróxido de hidrogênio, dependendo da dose aplicada (WANG et al., 2002). Apesar disso, dentre as moléculas doadoras de NO, o SNP tem mostrado os melhores resultados em estudos de pós-colheita (MURGIA et al., 2004).

Sabe-se que a longevidade da orquídea *E. ibaguense* varia de acordo com o tratamento utilizado sendo, 46, 55 e 76% maior quando tratadas com solução de condicionamento contendo 20% de sacarose por 12 horas, 2 mM STS por 30 minutos e 1 g m⁻³ Ethylbloc[®] por 6 horas, respectivamente (MORAES et al., 2007). Adicionalmente, a longevidade de *E. ibaguense* foi aumentada utilizando-se 1,5 ou 2 mM AVG em solução de condicionamento (MAPELI et al., 2009a), pulverização com 1,5 mM AOA (MAPELI et al., 2009b) ou a combinação de AVG e STS (MOURA et al., 2010). Já o tratamento com 1,0 mM AAS (MAPELI et al., 2009c) e 1,5 mM AOA (MAPELI et al., 2009b) não afetou a longevidade dessa espécie.

Diante disso, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar os efeitos do SNP em flores cortadas de *E. ibaguense*. Na primeira parte do presente estudo, investigou-se o efeito do SNP, em diferentes concentrações, aplicado em solução de condicionamento ou via pulverização, sobre a longevidade pós-colheita das inflorescências. Na segunda parte, foram avaliadas as modificações ocorridas no sistema antioxidativo das inflorescências tratadas com solução contendo alta concentração de SNP. E, na última, investigou-se o efeito do SNP na atividade da PAL, no teor de compostos fenólicos solúveis e os danos provocados às membranas celulares por meio da quantificação de MDA e do extravasamento de eletrólitos.

Referências bibliográficas

ARORA, A. Biochemistry of flower senescence. In: PALIYATH, G.; MURR, D.P.; HANDA, A.K.; LURIE, S (Eds.). **Postharvest biology and technology of fruits, vegetables and flowers**. Ames: Wiley-Blackwell, 2008. p.51-85.

BADIYAN, D.; WILLS, R.B.H.; BOWYER, M.C. Use of nitric oxide donor compound to extend the vase life of cut flowers. **HortScience**, v. 39, n. 6, p. 1371-1372, 2004.

BOWYER, M.C.; WILLS, R.B.H. Delaying postharvest senescence of cut flowers using nitric oxide. **Rural Industries Research and Development Corporation**, n. 3/51, 2003.

CHANG-LI, Z.; LI, L.; GUO-QUAN, X.G. The physiological responses of carnation cut flowers to exogenous nitric oxide. **Scientia Horticulturae**, v. 127, p. 424-430, 2011.

CORPAS, F.J.; PALMA, J.M.; LETERRIER, M.; DEL RÍO, R.A.; BARROSO, J.B. Nitric oxide and abiotic stress in higher plants. In: HAYAT, S.; MORI, M.; PICHTEL J.; AHMAD, A. (Eds.). **Nitric oxide in plant physiology**. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2010. p. 51-64.

DEL RIO, L.A.; CORPAS, F.J.; BARROSO, J.B. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. **Phytochemistry**, v. 65, p.783-792, 2004.

DUAN, X.; SU X.; YOU, Y.; QU, H.;LI, Y.; JIANG, Y. Effect of nitric oxide on pericarp browning of harvested longan fruit in relation to phenolic metabolism. **Food Chemistry**, v. 104, p. 571-576, 2007.

FERRANTE, A.; FRANCINI, A. Ethylene and leaf senescence. In: KHAN, N.A. **Ethylene action in plants**. New York: Springer, 2006. p. 51-67.

FINGER, F.L.; MORAES, P.J.; MAPELI, A.M.; BARBOSA, J.G.; CECON, P.R. Longevity of *Epidendrum ibaguense* flowers as affected by pre-loading treatments and vase solution. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 83, n. 2, p. 144-147, 2008.

HAYAT, S.; HASAN, S.A.; MORI, M.; FARIDUDDIN, Q.; AHMAD, A. Nitric oxide: chemistry, biosynthesis, and physiological role. In: HAYAT, S.; MORI, M.; PITCHEL, J.; AHMAD, A. (Eds.). **Nitric oxide in plant physiology**. Ames: Wiley-Blackwell, 2010. p. 1-16.

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.S. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância socioeconômica recente. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 14, n. 1, p. 37-52, 2008.

LAI, T.; WANG, Y.; LI, B.; QIN, G.; TIAN, S. Defense responses of tomato fruit to exogenous nitric oxide during postharvest storage **Postharvest Biology and Technology**, v. 62 p. 127-132, 2011.

LESHEM, Y.Y.; WILLS, R.B.H.; KU, V.V. Evidence for the function of the free radical gas – nitric oxide (NO[•]) – as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 11, p. 825-833, 1998.

MACIEL, C. **Mercado brasileiro de flores deve crescer 15% em 2012.** Disponível em: <<http://economia.uol.com.br/ultimas-noticias/redacao/2012/08/29/mercado-brasileiro-de-flores-deve-crescer-15-em-2012.jhtm>>. Acesso em: 26 nov. 2012.

MANJUNATHA, G.; GUPTA, K.J.; LOKESH, V.; MUR, L.A.J.; NEELWARNE, B. Nitric oxide counters ethylene effects on ripening fruits. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 4, p. 476-483, 2012.

MAPELI, A.M.; FINGER, F.L.; OLIVEIRA, L.S.; BARBOSA, J.G. Longevidade de inflorescências de *Epidendrum ibaguense* tratadas com aminoetoxivinilglicina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 3, p. 258-262, 2009a.

MAPELI, A.M.; OLIVEIRA, L.S.; FINGER, F.L.; BARBOSA, J.G.; BARROS, R.S. Longevidade de inflorescências de *Epidendrum ibaguense* Kunth tratadas com ácido aminoacético. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 15, n.1, p. 37-42, 2009b.

MAPELI, A.M.; MOURA, M.A.; FINGER, F.L.; BARBOSA, J.G. Manutenção da qualidade pós-colheita de inflorescências de *Epidendrum ibaguense*. **Magistra**, v. 21, n. 4, p. 321-329, 2009c.

MORAES, P.J.; FINGER, F.L.; BARBOSA, J.G.; CECON, P.R. Longevidade pós-colheita da orquídea *Epidendrum ibaguense* Kunth. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 31-37, 2007.

MOURA, A.; MAPELI, A.M.; FINGER, F.L.; BARBOSA, J.G. Vida de vaso de inflorescências de *Epidendrum ibaguense* Kunth tratadas com inibidores de etileno. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 16, n. 2; p. 146-152, 2010.

MURGIA I.; PINTO, M.C.; DELLEDONNE, C.S.; GARA L.D. Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death, and cell redox state in plant cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 777-783, 2004.

NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T. Nitric oxide signalling in plants. **New Phytologist**, v. 159, p. 11-35, 2003.

PALIYATH, G.; MURR, D.P.; HANDA, A.K.; LURIE, S. Postharvest biology and technology: an international perspective. In: PALIYATH, G.; MURR, D.P.; HANDA, A.K.; LURIE, S. (Eds.). **Postharvest biology and technology of fruits, vegetables and flowers**. Ames: Wiley-Blackwell, 2008. p. 1-18.

PROCHÁZKOVÁ, D.; WILHELMOVÁ, N. Nitric oxide, reactive nitrogen species and associated enzymes during plant senescence. **Nitric Oxide**, v. 24, p. 61-65, 2011.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; PERAZOLL, M.; ZAGO, E.D.; DELLEDONNE, M. Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 795-803, 2004.

SINGH, S.P.; SINGH, Z.; SWINNY, E.E. Postharvest nitric oxide fumigation delays fruit ripening and alleviates chilling injury during cold storage of Japanese plums (*Prunus salicina* Lindell). **Postharvest Biology and Technology**, v. 53, p. 101-108, 2009.

WANG, P.G.; XIAN, M.; TANG, X.; WU, X.; WEN, Z.; CAI, T.; JANCZUK, A.J. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 1091-1134, 2002.

WILLS, R.B.H.; KU, V.V.V.; LESHEM, Y.Y. Fumigation with nitric oxide to extend the postharvest life of strawberries. **Postharvest Biology and Technology**, v. 18, p. 75-79, 2000.

YANG, H.; ZHOU, C.; WU, F.; CHENG, J. Effect of nitric oxide on browning and lignification of peeled bamboo shoots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 57, p. 72-76, 2010.

YIN, J.; BAI, S.; WU, F.; LU, G.; YANG, H. Effect of nitric oxide on the activity of phenylalanine ammonia-lyase and antioxidative response in sweetpotato root in relation to wound-healing. **Postharvest Biology and Technology**, v. 74, p. 125-131, 2012.

ZHU, S.; SUN, L.; ZHOU, J. Effects of different nitric oxide application on quality of kiwifruit during 20°C storage. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, p. 245-251, 2010.

CAPÍTULO 1

EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NA LONGEVIDADE DE INFLORESCÊNCIAS DE *Epidendrum ibaguense* Kunth

RESUMO: O óxido nítrico (NO) tem propriedades anti-senescência, podendo estender a vida pós-colheita de muitos frutos, hortaliças e flores quando esses são tratados com concentrações micromolares de compostos doadores, como o nitroprussiato de sódio (SNP). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do NO aplicado na forma de condicionamento ou via pulverização, sobre a longevidade de inflorescências de *Epidendrum ibaguense*. Após a colheita, as hastes foram tratadas por 6, 24 e 48 horas com solução de condicionamento contendo 5, 10, 50, 100 e 500 μM de SNP ou pulverizadas com SNP nas mesmas concentrações, até o completo molhamento da inflorescência. Os controles foram feitos com água desionizada. Após o tratamento, as hastes foram colocadas em vaso com água desionizada, trocada a cada dois dias. Não foram observadas diferenças na longevidade das inflorescências quando tratadas com solução de SNP até a concentração 100 μM , independente do modo de aplicação. Inflorescências tratadas com 500 μM de SNP tiveram redução na longevidade e aumento na abscisão de flores. Nas inflorescências mantidas em solução de SNP, sintomas de toxidez, como o escurecimento do labelo, resultou na redução da longevidade de cinco para dois dias. A longevidade das inflorescências pulverizadas com 500 μM de SNP reduziu de 6,8 para 5,1 dias. Sendo assim, o uso de altas concentrações de compostos doadores de NO em solução de vaso ou via pulverização é tóxico para inflorescências de *E. ibaguense* e o NO não foi capaz de prolongar a vida pós-colheita .

Palavras-chave: vida de vaso, solução de vaso, pulverização.

ABSTRACT: Nitric oxide (NO) acts as an anti senescence substance, which may extend the postharvest life of fruits, vegetables and flowers when they are treated with micromolar concentrations of compounds as donor sodium nitroprusside (SNP). This work aimed to evaluate the effect of NO applied in conditioning solution or sprayed on the longevity of cut inflorescences of the orchid *Epidendrum ibaguense*. After the harvest the inflorescences were pulsed for 6, 24 or 48 hours with 5, 10, 50, 100 and 500 μM de SNP or by spraying, until complete wetting of the inflorescence. Controls were treated with distilled water. After the treatment the stems were placed in deionized water, changed every 2 days. No significant differences were observed in the longevity of flowers treated with 5, 10, 50 or 100 μM SNP, regardless of the mode of application. Inflorescences treated with 500 μM SNP in conditioning solution had reduced longevity and increased flower abscission. In inflorescences kept in SNP solution, toxic symptoms such as darkening of the labellum, resulting in reduced longevity for 2 days. The longevity of inflorescences sprayed with 500 μM SNP reduced from 6.8 to 5.1 days. Thus, use of high concentrations of NO donor compounds in vase solution or spraying is toxic to *E. ibaguense* inflorescences and NO was not able to extend the shelf-life.

Key-words: vase life, conditioning solution, spray.

1. INTRODUÇÃO

Devido à uniformidade e exuberância da cor de suas flores e por possuir haste floral longa, a orquídea *Epidendrum ibaguense* Kunth, cuja floração ocorre praticamente durante todo o ano, surge como flor de corte com grande potencial para comercialização (MOURA et al., 2010). No entanto, por ser uma espécie altamente sensível ao etileno, observa-se abscisão e senescência prematura das flores (MAPELI et al., 2009).

Alguns estudos sugerem que o óxido nítrico (NO) apresenta propriedades anti-senescência, podendo estender a vida pós-colheita de produtos hortícolas quando esses são tratados com compostos doadores de NO, como o nitroprussiato de sódio (SNP) ou 2,2'-(hidroxinitrosohidrazino)-bisetanamina (DETA/NO) (ARORA, 2008), como alternativa a outros compostos químicos utilizados, como o tiosulfato de prata (STS) e 1-metilciclopropeno (1-MCP) (SEYF et al., 2012).

O NO exerce o papel de proteção da célula contra o estresse oxidativo (YIN et al., 2012), inibe a expressão de genes envolvidos na rota biossintética do etileno (MANJUNATHA et al., 2012) e a peroxidação lipídica (PROCHÁZKOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011). No entanto, a promoção ou retardo na senescência floral pela aplicação de NO depende da concentração e da espécie em estudo (SANKHALA et al., 2004).

Em brotos de bambu, a aplicação de SNP estendeu a vida pós-colheita e promoveu manutenção da qualidade. Nesse caso, o SNP inibiu o escurecimento durante o armazenamento, promoveu manutenção da qualidade, inibindo a atividade das enzimas fenilalanina amônia liase (PAL), polifenol oxidase (PPO) e peroxidase (POD), bem como a biossíntese de etileno (YANG et al., 2010). Em frutos de morango fumigados com NO foi observado aumento de cerca de 50% na vida pós-colheita (WILLS et al., 2000). O tratamento pós-colheita de produtos hortícolas com baixa concentração de gás de NO pode prolongar a vida pós-colheita, entretanto, a aplicação a partir de um cilindro de gás não é viável em muitas situações da horticultura diante da complexidade do uso (WILLS et al., 2007).

A utilização de compostos doadores de NO aplicado nas hastes florais é considerada técnica simples e pode estender a vida de vaso de flores

cortadas (BADIYAN et al., 2004). Verificou-se aumento da vida pós-colheita de boca-de-leão, crisântemo, tulipa, gérbera, lírio, rosa e íris com a aplicação de 10 a 100 mg/L de DETA/NO em solução de vaso (BADIYAN et al., 2004). Bowyer e Wills (2003) mostraram que o uso de DETA/NO não pode ser considerado como tratamento universal aplicável a todas as espécies de flores, visto que nem todas as espécies estudadas apresentaram aumento na vida pós-colheita. A vida de vaso de flores cortadas de rosas aumentou de 11 para 13,3 dias quando tratadas com 50 μ M SNP por 24 horas (SEYF et al., 2012). Adicionalmente, verificou-se aumento no conteúdo de sólidos solúveis, taxa de absorção da solução e aumento de massa fresca.

Neste contexto, as flores de corte podem ser usadas como modelo para obter importantes informações sobre a ação do NO em plantas, podendo esclarecer como essa molécula afeta alguns processos fisiológicos e bioquímicos, visto que as informações existentes são escassas. Adicionalmente, o aumento na vida pós-colheita de vários produtos hortícolas demonstra a viabilidade do uso do NO e do SNP, devido à facilidade de manuseio e baixo custo (SEYF et al., 2012). No entanto, mais pesquisas são necessárias para avaliar a eficácia do SNP sobre a vida pós-colheita de flores cortadas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do SNP, sob duas formas de aplicação (pulverização ou solução de vaso na forma de condicionamento), sobre a longevidade pós-colheita de inflorescências cortadas de *Epidendrum ibaguense* Kunth.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de *Epidendrum ibaguense* foram cultivadas no campo de produção do Setor de Floricultura da Universidade Federal de Viçosa – MG (20°45' latitude sul, 45°51' longitude oeste; altitude de 642 m). As hastes foram colhidas entre 7 e 8 horas da manhã, no estágio 10 de abertura floral (mais da metade do número de botões florais da inflorescência abertos), conforme previamente estabelecido por Moraes (2003). Após a colheita, foram colocadas em baldes contendo água e levadas ao laboratório, onde foi feito o corte na base da haste em água e a padronização do comprimento para 25 cm. Em

seguida, foram distribuídas ao acaso de acordo com os tratamentos, descritos posteriormente.

Os experimentos foram conduzidos à temperatura de 25°C, umidade relativa de 50-70% e iluminação constante de 7-10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com luz branca. Diariamente, avaliou-se longevidade e abscisão das flores. Foi considerado como fim da longevidade quando as inflorescências apresentavam mais de 50% de abscisão ou murcha das flores (MORAES et al., 2007).

Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados com cinco repetições, e a unidade experimental composta por duas hastes. Para todos os parâmetros avaliados estimou-se o desvio ou erro-padrão da média.

2.1. Experimento I: efeito da solução de nitroprussiato de sódio em vaso na forma de 'pulsing'

Após a padronização, as hastes florais foram tratadas por 6, 24 e 48 horas ('pulsing') com solução de condicionamento nas concentrações de 5, 10, 50, 100 e 500 μM de SNP e os respectivos controles em água desionizada. Após o tratamento, as hastes foram mantidas em vaso com água desionizada até o final da vida de vaso. A cada 48 horas, realizou-se o corte a 2 cm na base da haste bem como a troca da água do vaso.

2.2. Experimento II: efeito da solução de nitroprussiato de sódio fornecida via pulverização

Após a padronização, as hastes florais foram pulverizadas com solução contendo 5, 10, 50, 100 e 500 μM de SNP até o completo molhamento da inflorescência (cerca de 15 mL por haste) e os respectivos controles em água desionizada. Após o tratamento, as hastes foram colocadas em vaso com água desionizada até o final da vida de vaso. A cada 48 horas realizou-se o corte na base da haste e a troca da água do vaso.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Experimento I: efeito da solução de nitroprussiato de sódio em vaso na forma de 'pulsing'

A longevidade das inflorescências, média de 4,6 dias a 25°C, não foi afetada pelo SNP aplicado nas concentrações de 5 a 100 µM por 6 horas. (Tabela 1).

Tabela 1 - Longevidade de inflorescências de *Epidendrum ibaguense* tratadas com soluções de diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP), em vaso, por diferentes períodos

'Pulsing' (horas)	SNP (µM)	Longevidade (dias)*
6	0	5,0 ± 0,31
	5	5,8 ± 0,20
	10	5,6 ± 0,40
	50	5,4 ± 0,74
	100	5,6 ± 0,24
	500	2,0 ± 0,00
	24	0
5		4,8 ± 0,80
10		4,4 ± 0,24
50		4,4 ± 0,24
100		4,0 ± 0,00
500		2,0 ± 0,00
48	0	4,0 ± 0,00
	5	5,4 ± 0,74
	10	5,0 ± 0,77
	50	4,0 ± 0,00
	100	4,0 ± 0,00
	500	2,0 ± 0,00

* Média ± erro-padrão da média.

Quando fornecido durante 24 horas, a solução contendo 100 μM SNP reduziu a longevidade das flores em 16% (Tabela 1). Já, quando fornecido durante 48 horas, as soluções contendo 5 e 10 μM SNP promoveram aumento da longevidade em 35 e 25%, respectivamente. A concentração de 500 μM causou efeito deletério, reduzindo a longevidade em 60, 58 e 50% quando fornecido por 6, 24 e 48 horas respectivamente.

Em *Lupinus havardii*, o tratamento com 100 μM de SNP reduziu a longevidade (SANKHLA et al., 2005). Em rosas, o tratamento com 100 μM SNP não alterou a longevidade floral (SEYF et al., 2012) e o tratamento com 40 μM SNP por 24 horas inibiu em cerca de 70% a produção de etileno e dobrou a vida de vaso das flores (MORTAZAVI et al., 2011). Em flores de cravo, foi observado aumento de 50% na vida pós-colheita quando tratadas com 10 mg L^{-1} DETA/NO (BOWYER et al., 2003). Em *ptilotus*, espécie insensível ao etileno, o aumento da vida pós-colheita com o uso de 10 e 100 ppm DETA/NO foi relacionado à manutenção do balanço hídrico (BOWYER; WILLS, 2003).

Flores de *E. ibaguense* mantidas em solução contendo 500 μM de SNP apresentaram, 48 horas após o tratamento, escurecimento do labelo (Figura 1), inviabilizando o produto para comercialização.

Baixas concentrações de NO em muitas flores cortadas e em frutos são mais eficientes em estender a vida pós-colheita comparadas às concentrações mais altas e os efeitos benéficos ou prejudiciais dos doadores de NO dependem da concentração e da sensibilidade dos genótipos em estudo (SEYF et al., 2012). Adicionalmente, alta concentração de NO pode causar toxidez por ser capaz de produzir cianeto, afetando o metabolismo celular (PROCHÁZKOVÁ; WILHELMOVÁ, 2012) ou devido sua reação com o ânion superóxido (SEYF et al., 2012). Em flores cortadas de *Phlox paniculata* L. 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SNP na solução de vaso causou amarelecimento das folhas e promoveu a senescência, sendo que, o uso de sacarose ou 1-MCP, juntamente com o SNP, minimizou a toxidez desse composto (SANKHLA et al., 2004). Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que o escurecimento no labelo de *E. ibaguense* provocado pelo SNP decorre da toxidez por NO quando esse composto é fornecido em altas concentrações, comprovando que, o efeito do NO em flores é dependente da concentração.



As setas indicam a injúria causada pelo SNP no labelo e no detalhe, flor com labelo escurecido.

Figura 1 - Inflorescências de *Epidendrum ibaguense* 48 horas após o tratamento com 0 (A) e 500 μM (B) de SNP, em solução de condicionamento.

A percentagem de abscisão aumentou ao longo do período de avaliação, com destaque para os efeitos promovidos pela solução contendo 500 μM de SNP, independente do tempo de 'pulsing' (Tabela 2). As inflorescências tratadas com 500 μM de SNP apresentaram, no segundo dia, 5,2, 7,3 e 18,1% de flores caídas quando tratadas por 6, 24 e 48 horas, respectivamente, enquanto, o controle, apresentou no máximo, 1,1%. Da mesma forma, o uso de 10 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SNP na solução de vaso de flores *Phlox paniculata* L. promoveu a abscisão (SANKHLA et al., 2004).

Tabela 2 - Percentagem de abscisão acumulada de flores de *Epidendrum ibaguense* tratadas com soluções de diferentes concentrações de SNP por diferentes períodos

'Pulsing' (horas)	SNP (μ M)	Dias após aplicação do tratamento				
		1	2	3	4	5
6	0	0 \pm 0	1,1 \pm 1,10	2,4 \pm 1,48	4,8 \pm 2,97	15,9 \pm 8,87
	5	0 \pm 0	1,2 \pm 1,20	3,9 \pm 2,55	6,2 \pm 3,43	13,1 \pm 4,02
	10	0 \pm 0	0 \pm 0	1,4 \pm 1,40	5,4 \pm 2,41	18,1 \pm 7,28
	50	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	5,1 \pm 3,37	15,0 \pm 7,63
	100	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	12,6 \pm 5,38	32,0 \pm 11,01
	500	0 \pm 0	5,2 \pm 2,62	-	-	-
24	0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	1,3 \pm 1,3	9,6 \pm 5,55
	5	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	2,3 \pm 1,41	5,7 \pm 3,93
	10	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	3,3 \pm 3,30	7,6 \pm 7,60
	50	0 \pm 0	0 \pm 0	1,4 \pm 1,40	4,7 \pm 3,28	18,0 \pm 4,82
	100	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	4,2 \pm 4,20	-
	500	0 \pm 0	7,3 \pm 5,96	-	-	-
48	0	0 \pm 0	0 \pm 0	1,4 \pm 1,40	5,7 \pm 2,67	-
	5	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	12,5 \pm 5,17	16,2 \pm 3,99
	10	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	11,1 \pm 7,65
	50	0 \pm 0	3,0 \pm 3,00	4,6 \pm 4,60	10,0 \pm 6,20	-
	100	0 \pm 0	1,2 \pm 1,20	1,2 \pm 1,20	21,5 \pm 6,11	-
	500	0 \pm 0	18,1 \pm 11,94	-	-	-

* Média \pm erro-padrão da média.

A percentagem de flores murchas aumentou ao longo dos dias avaliados, independente do tratamento (Tabela 3). O aumento e posterior queda na percentagem de flores murchas no 4º e 5º dias, em alguns tratamentos, explicam-se pelo aumento na abscisão. De maneira semelhante, elevada percentagem de murchamento nas inflorescências de *E. ibaguense* a partir do 4º dia de armazenamento, foi observada quando estas não foram tratadas com inibidores da síntese e da ação do etileno (AVG e STS) e sacarose (MAPELI et al., 2009).

No segundo dia, inflorescências tratadas com 500 µM de SNP, mesmo mostrando sintomas de toxidez, apresentaram menores percentagens de flores murchas sendo, 1,2% nas flores tratadas por 6 horas ou não apresentaram murchamento nas flores tratadas por 24 ou 48 horas (Tabela 3), sugerindo um possível papel do SNP na manutenção do balanço hídrico nos estádios iniciais da senescência. Ao final do período de avaliação, inflorescências tratadas com 5 µM de SNP por 6 horas apresentaram redução na percentagem de murchamento em 32% comparado ao controle. De maneira similar, Chang-li et al. (2011) observaram, em flores de cravo tratadas com 0,1 mmol L⁻¹ SNP, retardo no murchamento das pétalas e manutenção do balanço hídrico. Em *E. ibaguense*, o aumento na queda das flores provocadas pelo SNP e a redução no murchamento sugere que a abscisão não esteja relacionada à redução no teor hídrico das pétalas e sim, à produção de etileno.

O número de flores abertas se reduziu ao longo do período de avaliação e, no 5º dia após o tratamento, a menor percentagem de flores abertas pode ser relacionada ao aumento na percentagem de flores murchas ou caídas (Tabela 4). No 5º dia, a maior percentagem flores abertas (60,3%) foi observado nas inflorescências tratadas com 5 µM de SNP por 6 horas, e a menor (43,2%) nas inflorescências tratadas com 50 µM de SNP por 24 horas. As inflorescências tratadas com 50 µM por 48 horas, 100 µM por 24 horas e 500 µM por 6, 24 e 48 horas não foram avaliadas no 5º dia pelo excesso de flores murchas, caídas ou por apresentarem sintomas de toxidez em dias anteriores.

Tabela 3 - Percentagem de murchamento de flores de *Epidendrum ibaguense* tratadas com soluções de diferentes concentrações de SNP por diferentes períodos

'Pulsing' (horas)	SNP (μ M)	Dias após aplicação do tratamento				
		1	2	3	4	5
6	0	4,9 \pm 2,23	10,0 \pm 5,06	10,0 \pm 4,49	24,3 \pm 9,10	54,19 \pm 6,65
	5	2,6 \pm 2,66	2,5 \pm 2,50	6,0 \pm 3,06	18,3 \pm 6,15	36,5 \pm 6,04
	10	4,6 \pm 1,90	5,9 \pm 1,50	8,7 \pm 0,93	33,6 \pm 7,03	46,0 \pm 2,54
	50	0 \pm 0	4,3 \pm 2,69	11,0 \pm 7,30	41,4 \pm 9,91	44,5 \pm 5,90
	100	1,8 \pm 1,80	4,8 \pm 3,15	4,8 \pm 3,15	33,6 \pm 4,03	45,1 \pm 6,95
	500	0 \pm 0	1,2 \pm 1,25	-	-	-
24	0	0 \pm 0	9,1 \pm 4,49	11,8 \pm 5,17	47,3 \pm 5,49	45,5 \pm 2,98
	5	0 \pm 0	0 \pm 0	1,05 \pm 1,05	43,0 \pm 10,86	51,6 \pm 21,65
	10	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	43,1 \pm 5,01	49,1 \pm 3,70
	50	3,0 \pm 3,00	5,4 \pm 4,14	4,6 \pm 4,61	49,0 \pm 4,42	53,2 \pm 5,28
	100	0 \pm 0	1,3 \pm 1,30	13,8 \pm 5,02	67,1 \pm 5,18	-
	500	0 \pm 0	0 \pm 0	-	-	-
48	0	0 \pm 0	2,85 \pm 1,74	7,04 \pm 3,91	56,5 \pm 2,07	-
	5	0 \pm 0	4,04 \pm 2,49	6,6 \pm 4,09	37,0 \pm 7,08	41,6 \pm 0,26
	10	0 \pm 0	2,9 \pm 1,85	3,3 \pm 3,30	48,6 \pm 7,20	39,39 \pm 6,06
	50	3,0 \pm 3,00	6,3 \pm 1,61	7,9 \pm 4,87	56,8 \pm 4,03	-
	100	0 \pm 0	1,25 \pm 1,25	18,1 \pm 3,48	66,7 \pm 3,44	-
	500	0 \pm 0	0 \pm 0	-	-	-

* Média \pm erro-padrão da média.

Tabela 4 - Percentagem de flores abertas de *Epidendrum ibaguense* tratadas com soluções de diferentes concentrações de SNP por diferentes períodos

'Pulsing' (horas)	SNP (μ M)	Dias após aplicação do tratamento					
		0	1	2	3	4	5
6	0	100 \pm 0	89,6 \pm 4,61	88,9 \pm 5,53	88,8 \pm 4,82	74,4 \pm 9,85	41,2 \pm 8,04
	5	86,1 \pm 3,06	87,0 \pm 4,09	86,6 \pm 2,77	91,0 \pm 2,79	78,2 \pm 6,63	60,3 \pm 7,86
	10	91,8 \pm 3,00	88,8 \pm 3,36	90,3 \pm 3,32	88,5 \pm 1,43	64,4 \pm 7,29	45,5 \pm 5,15
	50	95,6 \pm 1,80	97,0 \pm 1,81	94,0 \pm 2,54	88,9 \pm 7,30	62,2 \pm 11,09	58,8 \pm 4,84
	100	92,8 \pm 5,53	92,4 \pm 3,93	89,3 \pm 3,65	95,1 \pm 3,15	67,5 \pm 4,38	45,2 \pm 5,85
	500	98,8 \pm 1,11	100 \pm 0	97,6 \pm 1,45	-	-	-
24	0	96,5 \pm 2,19	96,5 \pm 2,19	87,5 \pm 3,74	88,1 \pm 5,17	53,2 \pm 5,19	44,9 \pm 3,05
	5	97,3 \pm 1,64	98,7 \pm 1,25	98,7 \pm 1,25	98,9 \pm 1,05	57,5 \pm 10,82	51,3 \pm 26,38
	10	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	56,8 \pm 5,02	48,0 \pm 1,92
	50	93,3 \pm 3,65	90,5 \pm 4,72	90,5 \pm 4,72	94,3 \pm 5,71	51,5 \pm 4,77	43,2 \pm 4,53
	100	97,1 \pm 2,85	98,5 \pm 1,43	98,6 \pm 1,33	87,4 \pm 5,61	34,7 \pm 5,95	-
	500	96,6 \pm 3,33	96,9 \pm 3,07	91,1 \pm 7,48	-	-	-
48	0	95,7 \pm 1,75	100 \pm 0	97,14 \pm 1,75	94,3 \pm 4,16	44,5 \pm 1,49	-
	5	93,4 \pm 2,83	95,1 \pm 3,05	91,3 \pm 3,94	93,3 \pm 4,09	64,2 \pm 7,12	54,1 \pm 9,40
	10	93,4 \pm 3,45	95,9 \pm 1,70	93,6 \pm 2,04	96,6 \pm 3,33	51,8 \pm 6,84	50,0 \pm 16,6
	50	98,5 \pm 1,43	95,4 \pm 3,05	89,5 \pm 3,88	89,5 \pm 6,56	42,3 \pm 42,3	-
	100	94,3 \pm 1,53	95,6 \pm 1,87	93,1 \pm 0,61	81,8 \pm 3,47	30,4 \pm 2,43	-
	500	100 \pm 0	100 \pm 0	86,8 \pm 8,44	-	-	-

* Média \pm erro-padrão da média.

3.2. Experimento II: efeito da solução de SNP fornecida via pulverização

A maior longevidade (7,2 dias) foi observada nas flores pulverizadas com 10 μM de SNP, ocorrendo aumento de 5 % em relação ao controle (Tabela 5), que apresentou longevidade média de 6,5 dias. A menor longevidade (5,1 dias) foi observada quando as inflorescências foram pulverizadas com 500 μM de SNP, à semelhança do observado no experimento I, com redução de 25 % em relação ao controle.

Tabela 5 - Longevidade, em dias, de inflorescências de *Epidendrum ibaguense* pulverizadas com soluções de diferentes concentrações de SNP

SNP (μM)	Longevidade*
0	6,8 \pm 0,25
5	6,9 \pm 0,50
10	7,2 \pm 0,12
50	6,7 \pm 0,43
100	6,8 \pm 0,56
500	5,1 \pm 0,36

* Média \pm erro-padrão da média.

A vida pós-colheita de flores cortadas de cravo aumentou cerca de 30% quando tratadas com 1 e 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ NO (BOWYER et al., 2003). Em *E. ibaguense*, os resultados mostram o efeito deletério da pulverização com SNP em altas concentrações, seja pela produção de cianeto (PROCHÁZKOVÁ; WILHELMOVÁ, 2012) ou devido sua reação com o ânion superóxido (SEYF et al., 2012).

Diferentemente do observado em flores tratadas com SNP em solução de condicionamento, as flores pulverizadas com 500 μM de SNP não apresentaram escurecimento do labelo (Figura 2). Esse resultado comprova que o efeito do SNP em *E. ibaguense*, fornecido em altas concentrações, é dependente do modo de aplicação.



Figura 2 - Inflorescência de *Epidendrum ibaguense* 48 horas após a pulverização com 0 (A) e 500 μM (B) de SNP.

Inflorescências pulverizadas com 500 μM de SNP apresentaram maior percentagem de abscisão desde o início até o final do período avaliado (Tabela 6). Estas inflorescências apresentaram, no 6º dia, 84% de abscisão foliar, sendo 39% a mais que o controle. Até o 3º dia, a percentagem de abscisão foi, nas inflorescências pulverizadas com 5, 10, 50, e 100 μM SNP, menor que o valor observado no controle, constatando-se maior diferença (5,5%) nas inflorescências pulverizadas com 50 μM de SNP. Ao final do experimento, a menor percentagem de abscisão (56%) foi observada nas inflorescências

pulverizadas com 50 μM de SNP, uma redução de 10 % em relação ao controle. O aumento na taxa de abscisão de flores tratadas com 500 μM de SNP comprovou o efeito deletério do SNP em *E. ibaguense*, e sugere que não ocorreu inibição da síntese ou ação do etileno com o tratamento. Mapeli et al. (2009), verificaram a inibição de 81,5% na percentagem de abscisão de flores de *E. ibaguense* pulverizadas com 1,5 e 2 mM AVG e concluíram que a abscisão de flores dessa espécie está relacionada ao etileno.

A percentagem de flores murchas na inflorescência variou ao longo do período avaliado, devido à abscisão das flores (Tabela 7). Um aumento com posterior queda na percentagem de flores murchas está relacionado à abscisão, não podendo ser considerado bom índice para comparar os tratamentos. Maior percentagem de murchamento foi observada a partir do 5º dia de avaliação. Em rosas, 50 μM SNP na solução de condicionamento foi mais eficiente em promover aumento na absorção de água e massa fresca, comparado ao controle e ao tratamento com 100 μM SNP (SEYF et al., 2012).

Inflorescências pulverizadas com SNP apresentaram redução na percentagem de abertura floral ao longo do período avaliado (Tabela 8), independente da concentração utilizada, semelhante às tratadas com solução de SNP em vaso. Flores pulverizadas com 500 μM de SNP apresentaram redução de 23, 30 e 22% na percentagem de flores abertas comparado ao controle, no 4º, 5º e 6º dias, respectivamente, devido à alta taxa de abscisão.

Assim, pode-se concluir que o efeito do SNP na longevidade das flores de *E. ibaguense* foi dependente da concentração e do modo de aplicação. Além disso, o NO causou efeito deletério, quando aplicado em altas concentrações, por meio do aumento da abscisão de flores e escurecimento do labelo. Estudos futuros podem possibilitar o conhecimento do mecanismo de ação do NO em flores cortadas.

Tabela 6 - Percentagem de abscisão acumulada de flores de *Epidendrum ibaguense* pulverizadas com soluções de diferentes concentrações de SNP

SNP (μM)	Dias após aplicação do tratamento						
	1	2	3	4	5	6	7
0	5,0 \pm 1,52	9,6 \pm 1,17	12,1 \pm 1,40	18,4 \pm 3,65	26,0 \pm 5,92	44,6 \pm 6,96	56,1 \pm 5,97
5	4,2 \pm 2,02	5,2 \pm 2,82	8,3 \pm 3,30	17,2 \pm 5,50	21,9 \pm 4,87	38,0 \pm 7,30	50,6 \pm 7,45
10	2,1 \pm 1,36	4,8 \pm 2,12	9,8 \pm 3,63	13,5 \pm 5,13	23,4 \pm 7,27	46,5 \pm 4,92	52,7 \pm 4,57
50	3,9 \pm 1,32	6,0 \pm 2,07	6,6 \pm 1,92	15,8 \pm 1,96	25,3 \pm 5,39	48,5 \pm 2,58	52,7 \pm 5,11
100	2,7 \pm 1,21	4,8 \pm 2,42	8,6 \pm 2,85	18,8 \pm 2,23	28,7 \pm 3,73	42,7 \pm 6,59	54,4 \pm 4,99
500	9,1 \pm 1,52	14,4 \pm 3,72	14,4 \pm 3,72	34,5 \pm 5,51	59,7 \pm 5,27	84,0 \pm 2,86	-

* Média \pm erro-padrão da média.

Tabela 7 - Percentagem de murchamento de flores de *Epidendrum ibaguense* pulverizadas com soluções de diferentes concentrações de SNP

SNP (μM)	Dias após aplicação do tratamento						
	1	2	3	4	5	6	7
0	3,0 \pm 2,42	2,6 \pm 0,68	5,9 \pm 2,19	2,0 \pm 1,38	12,2 \pm 1,11	24,7 \pm 6,47	14,2 \pm 2,10
5	0,6 \pm 0,6	3,5 \pm 1,83	4,9 \pm 2,58	2,2 \pm 0,94	21,5 \pm 4,74	18,5 \pm 7,07	9,2 \pm 1,91
10	2,2 \pm 0,93	4,2 \pm 2,50	6,8 \pm 2,22	4,0 \pm 1,19	13,9 \pm 2,17	14,9 \pm 2,60	6,8 \pm 4,87
50	2,6 \pm 1,13	1,5 \pm 1,50	7,1 \pm 1,84	9,7 \pm 2,25	16,6 \pm 2,23	6,94 \pm 2,68	17,8 \pm 4,41
100	0 \pm 0	5,11 \pm 1,74	6,7 \pm 1,44	7,6 \pm 2,15	24,2 \pm 6,49	4,6 \pm 4,19	19,4 \pm 9,48
500	2,0 \pm 0,86	1,9 \pm 1,23	5,9 \pm 2,61	6,0 \pm 2,72	11,8 \pm 5,24	12,1 \pm 7,22	-

* Média \pm erro-padrão da média.

Tabela 8 - Percentagem de flores abertas de inflorescências de *Epidendrum ibaguense* pulverizadas com soluções de diferentes concentrações de SNP

SNP (μM)	Dias de armazenamento							
	0	1	2	3	4	5	6	7
0	99,1 \pm 0,83	96,2 \pm 1,18	93,0 \pm 1,39	87,4 \pm 2,49	91,8 \pm 2,24	78,4 \pm 4,18	53,7 \pm 5,42	51,6 \pm 3,68
5	96,5 \pm 1,53	95,1 \pm 1,77	91,2 \pm 2,25	87,4 \pm 5,66	83,6 \pm 8,14	65,1 \pm 5,83	57,2 \pm 3,72	53,3 \pm 2,41
10	93,5 \pm 1,67	92,5 \pm 1,78	91,4 \pm 4,33	83,8 \pm 5,75	87,2 \pm 4,04	71,6 \pm 4,06	54,0 \pm 1,72	55,1 \pm 2,42
50	94,7 \pm 0,83	94,1 \pm 2,05	93,4 \pm 2,25	90,2 \pm 3,65	82,3 \pm 4,66	67,6 \pm 6,17	57,9 \pm 2,60	49,0 \pm 4,43
100	93,8 \pm 1,97	99,3 \pm 0,66	92,1 \pm 1,28	89,5 \pm 2,54	81,8 \pm 2,34	61,7 \pm 7,11	66,4 \pm 3,50	53,5 \pm 6,77
500	98,3 \pm 1,03	92,2 \pm 1,50	89,3 \pm 4,46	86,0 \pm 3,51	68,0 \pm 6,44	48,1 \pm 8,56	31,5 \pm 7,33	-

* Média \pm erro-padrão da média.

4. CONCLUSÕES

1. Inflorescências tratadas com SNP em solução de condicionamento apresentaram redução na percentagem de murchamento das flores até 48 horas após o tratamento.
2. Inflorescências tratadas com 500 μM de SNP apresentaram redução na longevidade e aumento na percentagem de abscisão, independente do modo e tempo de aplicação.
3. O SNP fornecido via solução de condicionamento e em alta concentração causou toxidez nas inflorescências, que apresentaram escurecimento do labelo 48 horas após o tratamento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARORA, A. Biochemistry of flower senescence. In: PALIYATH, G.; MURR, D.P.; HANDA, A.K.; LURIE, S. (Eds.). **Postharvest biology and technology of fruits, vegetables and flowers**. Ames: Wiley-Blackwell, 2008. p. 51-85.

BADIYAN, D.; WILLS, R.B.H.; BOWYER, M.C. Use of a nitric oxide donor compound to extend the vase life of cut flowers. **HortScience**, v. 39, p. 1371-1372, 2004.

BOWYER, M.C.; WILLS, R.B.H. Delaying postharvest senescence of cut flowers using nitric oxide. **Rural Industries Research and Development Corporation**, n. 03/51, 2003.

BOWYER, M.C.; WILLS, R.B.H.; BADIYAN, D.; KU, V.V.V. Extending the postharvest life of carnations with nitric oxide – comparison of fumigation and in vivo delivery. **Postharvest Biology and Technology**, v. 30, p. 281-286, 2003.

CHANG-LI, Z.; LI, L.; GUO-QUAN, X.G. The physiological responses of carnation cut flowers to exogenous nitric oxide. **Scientia Horticulturae**, v. 127, p. 424-430, 2011.

MANJUNATHA G.; GUPTA, K.J.; LOKESH, V.; MUR, L.A.J.; NEELWARNE, B. Nitric oxide counters ethylene effects on ripening fruits. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 4, p. 476-483, 2012.

MAPELI, A.M.; FINGER, F.L.; OLIVEIRA, L.S.; BARBOSA, J.G. Longevidade de inflorescências de *Epidendrum ibaguense* tratadas com aminoetoxivinilglicina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 3, p. 258-262, 2009.

MORAES, P.J. **Crescimento, caracterização da abertura floral e manejo pós-colheita de flores de *Epidendrum ibaguense* Kunth**. 2003. 110 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MORAES, P.J.; FINGER, F.L.; BARBOSA, J.G.; CECON, P.R. Longevidade pós-colheita da orquídea *Epidendrum ibaguense*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 31-37, 2007.

MORTAZAVI, S.N.; TALEBI, S.; NADERI, R.; SHARAFI, Y. Regulation of ethylene biosynthesis by nitric oxide and thidiazuron during postharvest of rose. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 20, p. 5177-5183, 2011.

MOURA, A.; MAPELI, A.M.; FINGER, F.L.; BARBOSA, J.G. Vida de vaso de inflorescências de *Epidendrum ibaguense* Kunth tratadas com inibidores de etileno. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 16, n. 2, p. 146-152, 2010.

PROCHÁZKOVÁ, D.; WILHELMOVÁ, N. Nitric oxide, reactive nitrogen species and associated enzymes during plant senescence. **Nitric Oxide**, v. 24, p. 61-65, 2011.

SANKHLA, N.; MACKAY, W.A.; DAVIS, T.D. Alleviation of nitric oxide-induced flowers abscission and leaf toxicity in Phlox by sucrose e 1-MCP. **HortScience**, v. 39, n. 4, p. 823, 2004.

SANKHLA, N.; MACKAY, W.A.; DAVIS, T.D. Effect of nitric oxide generating compounds on flower senescence in cut racemes of pink flowered *Lupinus Havardii* wats. **Plant Growth Regulation Society of America**, v. 33, p. 126-132, 2005.

SEYF, M.; KHALIGHI A.; MOSTOFI, Y.; NADERI, R. Effect of sodium nitroprusside on vase life and postharvest quality of a cut rose cultivar (*Rosa hybrida* 'Utopia'). **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 12, p. 174-181, 2012.

WILLS, R.B.H.; KU, V.V.V.; LESHEM, Y.Y. Fumigation with nitric oxide to extend the postharvest life of strawberries. **Postharvest Biology and Technology**, v. 18, p. 75-79, 2000.

WILLS, R.B.H.; SOEGIARTO, L.; BOWYER M.C. Use of a solid mixture containing diethylenetriamine/nitricoxide (DETANO) to liberate nitric oxide gas in the presence of horticultural produce to extend postharvest life. **Nitric Oxide**, v. 17, p. 44-49, 2007.

YANG, H.; ZHOU, C.; WU, F.; CHENG, J. Effect of nitric oxide on browning and lignification of peeled bamboo shoots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 57, p. 72-76, 2010.

YIN, J.; BAI, S.; WU, F.; LU, G.; YANG, H. Effect of nitric oxide on the activity of phenylalanine ammonia-lyase and antioxidative response in sweetpotato root in relation to wound-healing. **Postharvest Biology and Technology**, v. 74, p. 125-131, 2012.

CAPÍTULO 2

RESPOSTAS ANTIOXIDATIVAS DE FLORES DE *Epidendrum ibaguense* TRATADAS COM SOLUÇÃO CONTENDO ALTA CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

RESUMO: O óxido nítrico (NO) foi identificado como agente inibidor da senescência e da deterioração de flores e hortaliças podendo, dentre outras funções, dissipar o excesso de radicais livres do tecido. No entanto, pode resultar em danos celulares quando em excesso. O objetivo desse trabalho foi estudar as modificações ocorridas no sistema antioxidativo de inflorescências de *Epidendrum ibaguense*, tratadas com solução contendo alta concentração de nitroprussiato de sódio (SNP). As hastes de *E. ibaguense* foram pulverizadas ou mantidas em solução de condicionamento contendo 500 µM de SNP por 6 horas, com os respectivos controles em água. Após o tratamento, as hastes foram mantidas em vasos contendo água desionizada até o final da vida de vaso. Foi avaliada a atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), ascorbato peroxidase (APX) e polifenoloxidase (PPO). Em flores pulverizadas com SNP observou-se inibição para a atividade da POD. A atividade das enzimas CAT, APX e PPO não foi alterada pelo SNP. Houve inibição de 47%, comparado ao controle, para a atividade da SOD em flores tratadas com SNP em vaso, 48 horas após a aplicação do tratamento, quando as flores foram eliminadas devido ao escurecimento do labelo, sugerindo que o dano tenha sido causado pela inibição da atividade de enzimas antioxidativas pelo SNP. Dessa forma, o excesso de NO no tecido inibe a atividade de enzimas do sistema antioxidativo. **Palavras-chave:** solução de vaso, pulverização, enzimas antioxidativas.

ABSTRACT: Nitric oxide (NO) has been identified as an inhibitor of senescence and deterioration of flowers and vegetables can dissipate excess free radical issue. However, NO may result in cellular damage when excessive. This work aimed to study the change in the antioxidative system of cut inflorescences of *Epidendrum ibaguense* treated with high concentrations of sodium nitroprusside (SNP). Cut inflorescences of *Epidendrum ibaguense* were treated with solution containing 500 µM SNP in conditioning solution for six hours and sprayed with the same solution until complete wetting, in different experiments. Then, the inflorescences were maintained in vase containing desionized water until the end of vase life. We evaluated the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), ascorbate peroxidase (APX) and polyphenol oxidase (PPO). In flowers sprayed with SNP observed inhibition of POD. CAT, APX and PPO activities was not affected by SNP. There was inhibition of 47% compared to control for SOD activity in flowers treated with SNP in conditioning solution, 48 hours after treatment, when the inflorescences were eliminated due to the darkening of the labellum, suggesting that the damage was caused by inhibition of the activity of antioxidant enzymes by SNP. Thus, excess NO inhibits the enzyme activity of the antioxidant system. **Key-words:** conditioning solution, sprayed, antioxidative enzymes.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Epidendrum ibaguense* Kunth (Orchidaceae) está entre as espécies ornamentais com grande potencial para comercialização como flor de corte (FINGER et al., 2008). No entanto, apresenta abertura floral irregular e incompleta, além de intensa descoloração e murchamento das flores, o que ocorre dentro de poucos dias após a colheita. A senescência pós-colheita é uma das principais limitações à comercialização de várias espécies de flores cortadas e um esforço considerável tem sido dedicado ao desenvolvimento de tratamentos para ampliar a vida de vaso dos produtos (MOURA et al., 2010).

Na fase de senescência e quando as plantas são submetidas a algum estresse fisiológico podem ocorrer alterações bioquímicas, que geram espécies reativas de oxigênio (ROS) como ânion superóxido (O_2^-), radicais hidroxil (OH^\cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (O_2) (SIS et al., 2012). Quando acima do limiar, as ROS podem danificar proteínas e lipídeos, levando à perda de integridade e funcionalidade das membranas (SIS et al., 2012). As ROS são controladas e balanceadas pelo sistema antioxidativo e as células podem reagir ao acúmulo das ROS pelo aumento da atividade das enzimas antioxidativas como dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) (BAVITA et al., 2012).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula multifuncional que exerce importante papel em resposta ao estresse e à senescência de produtos hortícolas (DEL RÍO et al., 2004). Como observado em raízes de batata-doce (YIN et al., 2012) dissipa o excesso de radicais livres do tecido, suplementando outros mecanismos de detoxificação das plantas (DEL RÍO et al., 2004). O NO tem a capacidade de reagir com alguns radicais, como o O_2^- , produzindo peroxinitrito ($ONOO^-$) e também pode estar envolvido em outros processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares durante o crescimento e desenvolvimento das plantas (YANG et al., 2010).

Em plantas de milho submetidas à deficiência de ferro, o NO potencializa o sistema antioxidativo, reagindo diretamente com as ROS ou ativando enzimas do sistema antioxidativo. Consequentemente, protege as plantas do estresse oxidativo (SUN et al., 2007). A SOD, primeira linha de

defesa contra o O_2^- , é significativamente regulada pelo NO em frutos de pêssigo (SIS et al., 2012) e tomate (ZHAO et al., 2011). A atividade da CAT em frutos de pêssigo tratados com 1 mM SNP foi 1, 17 e 1, 36 vezes maior que em frutos controle (não tratados) 20 e 30 dias após o tratamento, respectivamente (SIS et al., 2012). O efeito protetor do SNP também foi observado em trigo submetido ao estresse por alta temperatura (BAVITA et al., 2012). Em maçãs, o tratamento com 10 mg L^{-1} 2,2'-(hidroxinitrosohidrazino)-bisetanamina (DETA/NO) inibiu a atividade da polifenol oxidase (PPO, EC 1.10.3.1) e o consequente escurecimento na superfície do fruto (HUQUE et al., 2013).

Em flores de cravo tratadas com $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ SNP foi observado aumento de 7,4 dias na vida de vaso, comparado ao controle e melhoria do sistema antioxidativo com ativação das enzimas SOD, POD, CAT e APX e consequente eliminação das ROS (CHANG-LI et al., 2011). Em brotos de bambu, a aplicação de SNP estendeu a vida pós-colheita e promoveu manutenção da qualidade, inibindo a atividade das enzimas fenilalanina amônia liase (PAL, EC 4.3.1.5), PPO e POD (YANG et al., 2010). Em *E. ibaguense*, conforme discutido no capítulo anterior, foi observado redução da longevidade em até 3 dias quando as inflorescências foram tratadas com $500 \mu\text{M}$ de SNP em vaso, e de 1,7 dias quando pulverizadas com a mesma solução.

O objetivo deste trabalho foi estudar as modificações ocorridas no sistema antioxidativo de inflorescências cortadas de *E. ibaguense*, tratadas com solução contendo $500 \mu\text{M}$ de SNP.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As plantas de *E. ibaguense* foram cultivadas no campo de produção do Setor de Floricultura da Universidade Federal de Viçosa – MG ($20^\circ 45'$ latitude sul, $45^\circ 51'$ longitude oeste; altitude de 642 m). As hastes foram colhidas entre 7 e 8 horas no estágio 10 de abertura floral (mais da metade do número de botões florais abertos), conforme estabelecido por Moraes (2003). Após a colheita, foram colocadas em baldes contendo água e levadas ao laboratório, onde foi feita a padronização do comprimento para 25 cm, com o corte na base da haste em água.

Após a padronização, as hastes foram distribuídas ao acaso e tratadas com solução contendo 500 μM de SNP em dois modos de aplicação: solução de condicionamento (“pulsing”) ou pulverização. O respectivo controle foi tratado com água. As hastes tratadas com SNP em solução de condicionamento foram mantidas em vasos com 400 mL da solução por 6 horas e, inflorescências tratadas com SNP via pulverização, foram pulverizadas até o completo molhamento utilizando cerca de 15 mL de solução.

Após o tratamento, as hastes foram mantidas em vaso contendo 400 mL de água desionizada até o final da longevidade. Foi considerado como fim da vida de vaso quando as inflorescências apresentavam mais de 50% de abscisão ou murcha das flores (MORAES et al., 2007).

A troca da água do vaso e o corte a 2 cm na base da haste foram feitos a cada dois dias.

Os experimentos foram conduzidos à temperatura de 25 °C, umidade relativa de 50-70% e iluminação constante ($7-10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Antes do tratamento e 24, 48 e 96 horas após, determinou-se a atividade das enzimas SOD, CAT, POD, APX e PPO.

2.1. Obtenção do extrato enzimático bruto e determinação das atividades das enzimas SOD, CAT, POD e APX

Foram coletadas, ao acaso, 0, 24, 48 e 96 horas após o tratamento, 0,3 g de massa fresca de flores de *E. ibaguense* que foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer horizontal a -20°C, até o momento da análise.

Para obtenção do extrato bruto para determinação da atividade das enzimas, o material vegetal foi homogeneizado em nitrogênio líquido, seguido da adição de 2 mL de meio de extração, filtração através de quatro camadas de gaze e de centrifugação a 12.000 g, por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade enzimática. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram realizadas a 4°C.

O meio de extração foi composto de tampão fosfato de potássio a 0,1 M pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 0,1 M, fluoreto de

fenilmetilsulfônico (PMSF) a 1 mM e 1% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) (p/v) (PEIXOTO et al., 1999).

2.1.1. Determinação da atividade da SOD (EC 1.15.1.1)

Para determinação da atividade da SOD, alíquotas de 30 µL do extrato enzimático bruto foi adicionado a 2,79 mL do meio de reação contendo tampão fosfato de sódio a 50 mM pH 7,8, metionina a 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) a 75 µM, EDTA a 0,1 mM e riboflavina a 2 µM (DEL LONGO et al., 1993).

A reação foi conduzida a 25 °C em câmara de reação sob iluminação de lâmpada fluorescente de 15 W mantida no interior de uma caixa fechada. Após 5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida a 560 nm (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A absorbância a 560 nm, de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro, por igual tempo, serviu de “branco” e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação. Uma unidade (U) de SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971) e a atividade da enzima foi expressa em U SOD min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.1.2. Determinação da atividade da CAT (EC 1.11.1.6)

Para determinação da atividade da CAT, alíquotas de 0,1 mL do extrato enzimático bruto foi adicionado a 2,9 mL do meio de reação contendo tampão fosfato de potássio a 50 mM pH 7,0 e H₂O₂ a 12,5 mM (HAVIR; MCHALE, 1987). O decréscimo na absorbância a 240 nm à temperatura de 25°C foi medido durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do H₂O₂ de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson et al., 1995) e expressa em µmol H₂O₂ consumido min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.1.3. Determinação da atividade da POD (EC 1.11.1.7)

Para determinação da atividade da POD, alíquotas de 0,1 mL do extrato enzimático bruto foi adicionado a 2,9 mL do meio de reação contendo tampão fosfato de potássio a 25 mM pH 6,8, guaicol a 20 mM e H₂O₂ a 20 mM. O acréscimo na absorvância a 420 nm à temperatura de 25°C foi medido durante o primeiro minuto de reação (KAR; MISHRA, 1976). A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do guaiacol de 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹ e expressa em µmol guaiacol consumido min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.1.3. Determinação da atividade da APX (EC 1.11.1.11)

Para determinação da atividade da APX alíquotas de 0,1 mL do extrato enzimático bruto foi adicionado a 2,9 mL do meio de reação contendo tampão fosfato de potássio a 50 mM pH 6,0, ácido ascórbico a 0,8 mM e H₂O₂ a 1,0 mM (NAKANO; ASADA, 1981, modificado por Koshiha, 1993). O decréscimo na absorvância a 290 nm à temperatura de 25°C foi medido durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do ascorbato de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ (NAKANO; ASADA, 1981) e expressa em µmol ascorbato consumido min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.1.4. Determinação da atividade da enzima PPO (EC 1.10.3.1)

Foram coletadas, ao acaso, 1,0 g de massa fresca de flores de *E. ibaguense*, que foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer horizontal a -20°C até o momento da análise.

Para obtenção do extrato bruto, o material vegetal foi triturado em politron juntamente com 5 mL de meio de extração composto de tampão fosfato de potássio a 0,1 M pH 6,5, 1% polivinilpirrolidona (PVP) (p/v) e 0,1% Triton X-100 (p/v) até a completa homogeneização. Em seguida, esse homogeneizado foi centrifugado a 14.000 g por 30 minutos e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade da enzima. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram realizadas a 4°C (CONCELLÓN et al., 2004).

Para determinação da atividade enzimática, uma alíquota do extrato enzimático bruto foi adicionado ao meio de reação contendo 0,5 mL de tampão fosfato de potássio a 0,1 M pH 7,0 e 0,5 mL de catecol a 15 mM. A quantidade de extrato enzimático variou de acordo com a amostra, totalizando o volume total da reação de 1,5 mL. A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro pela variação na absorbância a 420 nm, à temperatura de 25°C, durante 2,5 minutos. A atividade enzimática foi expressa em UA min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (KAVRAYAN; AYDEMIR, 2001).

2.2. Análise quantitativa das proteínas

As proteínas das amostras foram quantificadas de acordo com o método de Bradford (1976) utilizando soro albumina bovino como padrão. O valor obtido, em mg, foi utilizado para expressar a atividade das enzimas.

2.3. Análise estatística

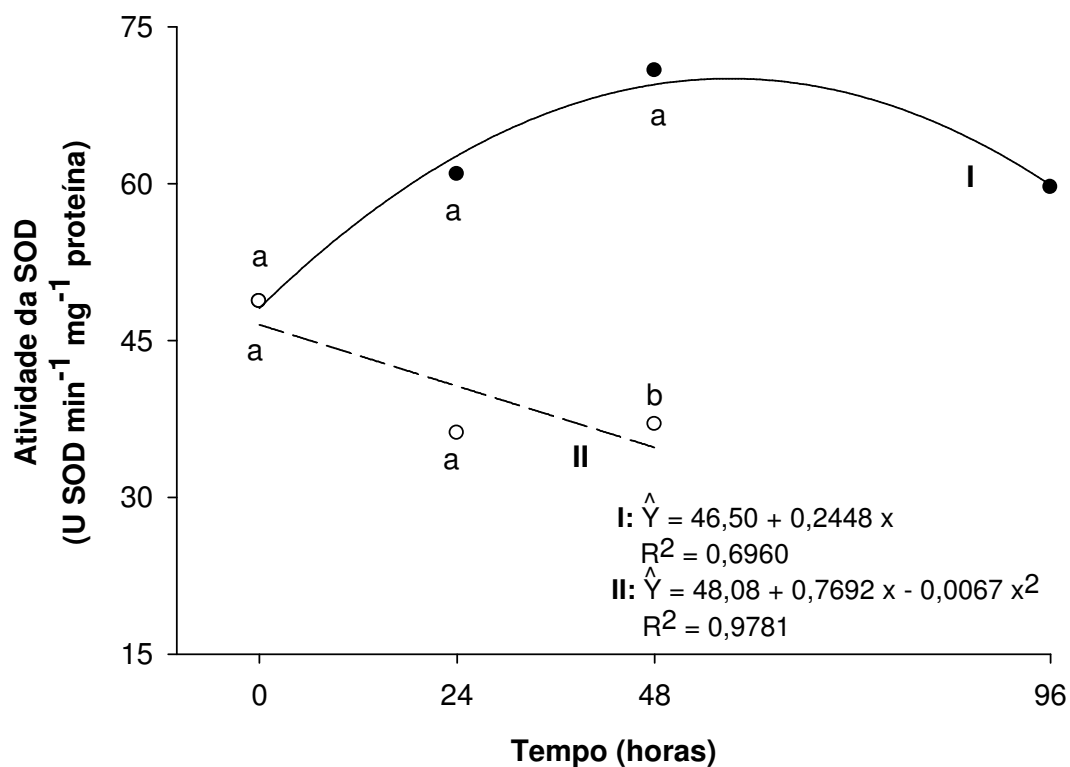
Utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso com cinco repetições. Os dados foram interpretados por meio da análise de variância e regressão utilizando o Sistema para Análises Estatísticas (SAEG), versão 9 (UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV, 2007). As médias referentes aos tratamentos qualitativos foram comparadas por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores obtidos a partir de tratamentos quantitativos foram submetidos à análise de regressão, sendo o modelo escolhido com base no coeficiente de determinação, no desvio-padrão dos coeficientes de regressão e no fenômeno biológico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Experimento I: inflorescências tratadas com SNP em solução de condicionamento

A atividade da SOD em inflorescências de *E. ibaguense* mantidas em água (controle) aumentou até 48 horas e reduziu de 48 até 96 horas (Figura 1).

Nas flores tratadas com SNP a atividade dessa enzima reduziu do início até o final do período avaliado, ocorrendo inibição de 47%, comparado ao controle, 48 horas após a aplicação do tratamento, quando as flores foram eliminadas devido ao escurecimento do labelo.



Médias seguidas pela mesma letra, para o mesmo tempo de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

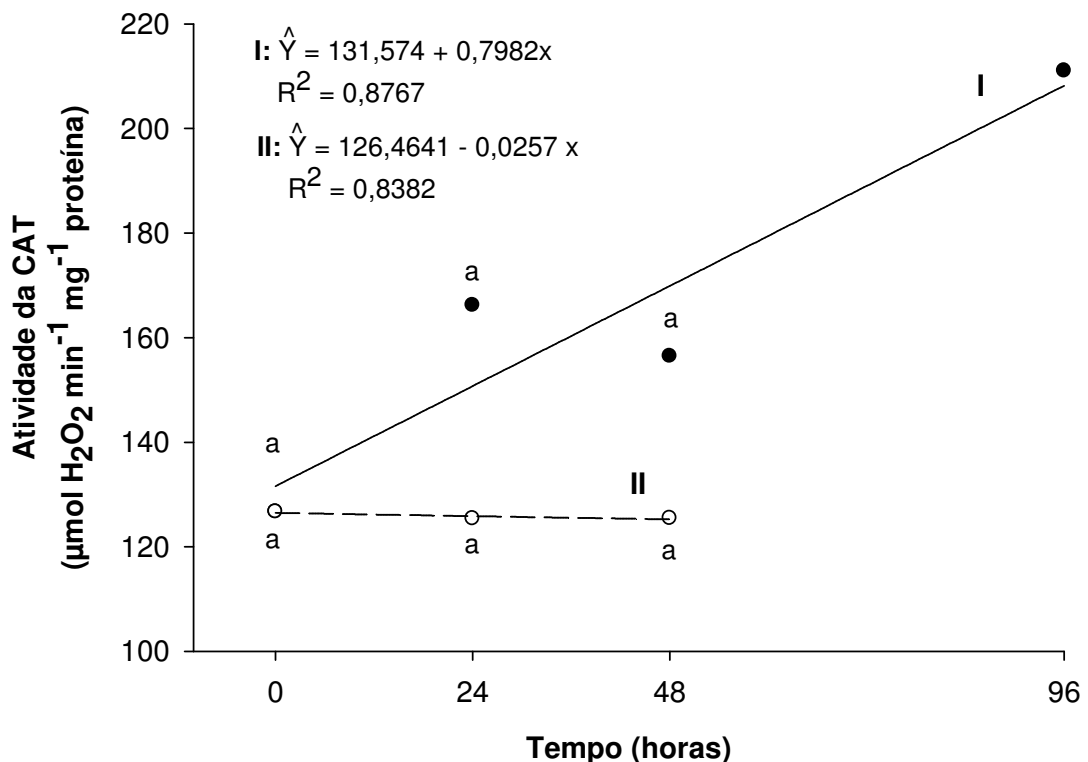
Figura 1 - Atividade da SOD (U SOD min⁻¹ mg⁻¹ proteína) em inflorescências cortadas de *Epidendrum ibaguense* mantidas em água (—) e solução contendo 500 µM de SNP (---).

As SODs são metaloenzimas que protegem as células dos radicais O₂[•] reduzindo-o a O₂ e H₂O₂ e formam a primeira linha de defesa contra as ROS. Sua atividade tem sido associada aos estresses fisiológicos, como baixa temperatura, estresses hídricos e oxidativos (LURIE, 2003). Quando fornecido em baixas concentrações o NO promove ativação dessa enzima, potencializando o sistema de defesa. Assim, em raízes de batata-doce, o tratamento com 0,5 mM SNP aumentou em 33% a atividade da SOD. Já, o tratamento com 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-

oxide (cPTIO), sequestrador de NO, inibiu a atividade da enzima em 22% comparado ao controle (YIN et al., 2012). Portanto, o aumento da atividade dessa enzima poderia, além de proteger a célula do estresse oxidativo, retardar a senescência do produto, o que não ocorreu nas flores de *E. ibaguense*.

Em frutos de kiwi tratados com $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ NO foi observado ativação da SOD, porém, o tratamento com $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NO inibiu a atividade da enzima e acelerou a senescência (ZHU et al., 2008), conforme observado em *E. ibaguense*. A redução da atividade da SOD em flores de *E. ibaguense*, mantidas em solução contendo alta concentração de SNP, pode ter causado o escurecimento do labelo dessas flores, aumento das ROS e consequentemente, a senescência precoce.

A atividade da CAT em inflorescências de *E. ibaguense* mantidas em água (controle) aumentou até 96 horas após o tratamento, apresentando crescimento linear (Figura 2).



Médias seguidas pela mesma letra, para o mesmo tempo de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 2 - Atividade da CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$) em inflorescências cortadas de *Epidendrum ibaguense* mantidas em água (—) e solução contendo $500 \mu\text{M}$ de SNP (---).

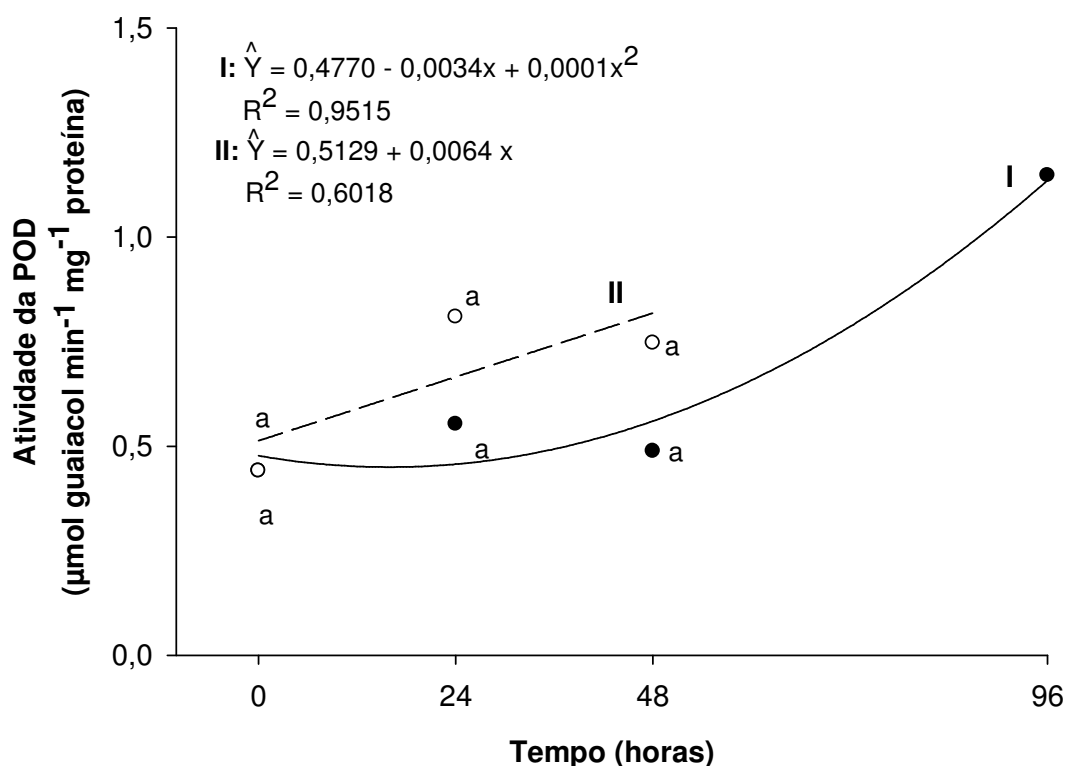
Nas inflorescências tratadas com solução de condicionamento contendo 500 µM de SNP a atividade da CAT permaneceu constante, não diferindo do controle até 48 horas após o tratamento (Figura 2). Em pêssego tratados com 0,5 e 1,0 mM SNP, o NO promoveu na atividade da CAT até 20 dias após o tratamento comparado ao controle em água e, ao final da vida de prateleira, a atividade decresceu (SIS et al., 2012).

Nas inflorescências controle, o aumento da atividade da CAT ao longo do período de armazenamento pode estar relacionado ao aumento da atividade da SOD até 48 horas após o tratamento. Uma vez que a CAT é uma enzima importante contra o estresse oxidativo por eliminar o H₂O₂ formado pela SOD formando H₂O e O₂ nas células (LURIE, 2003).

Nas inflorescências tratadas com SNP, o NO não ativou a CAT, porém, essa ativação pode não ter ocorrido devido à inibição na atividade da SOD ao longo do período de avaliação.

Em cravos tratados com 0,1 mM SNP, foi verificado estímulo à atividade da CAT com o SNP comparado ao controle mantido em água (CHANG-LI et al., 2011). Entretanto, esse aumento ocorreu do meio para o final do período de avaliação. Em nabos tratados com 100 µmol/L SNP ocorreu estímulo na atividade da CAT, comparado ao controle não tratado, no início do período avaliado (CHEN et al., 2007). O efeito protetor do NO em condições de estresse foi observado em raízes de trigo submetidas à alta temperatura e tratados com 50 e 100 µM SNP, comparado ao controle não tratado, pelo aumento da atividade da CAT (BAVITA et al., 2012). Em kiwi, verificou-se que o NO promove ativação das enzimas SOD e CAT mantendo a qualidade pós-colheita (ZHU et al., 2008). Assim, esses resultados sugerem que o efeito do SNP varia de acordo com a espécie em estudo.

Em flores de *E. ibaguense*, independente do tratamento, foi observado aumento da atividade da POD ao longo do período avaliado (Figura 3) podendo, essa enzima, ser considerada enzima indicadora de senescência (SELÇUKCAN; CEVAHIR, 2008). Em frutos, com a maturidade observa-se aumento na atividade dessa enzima e decréscimo na atividade da SOD e CAT (LURIE, 2003).



Médias seguidas pela mesma letra, para o mesmo tempo de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

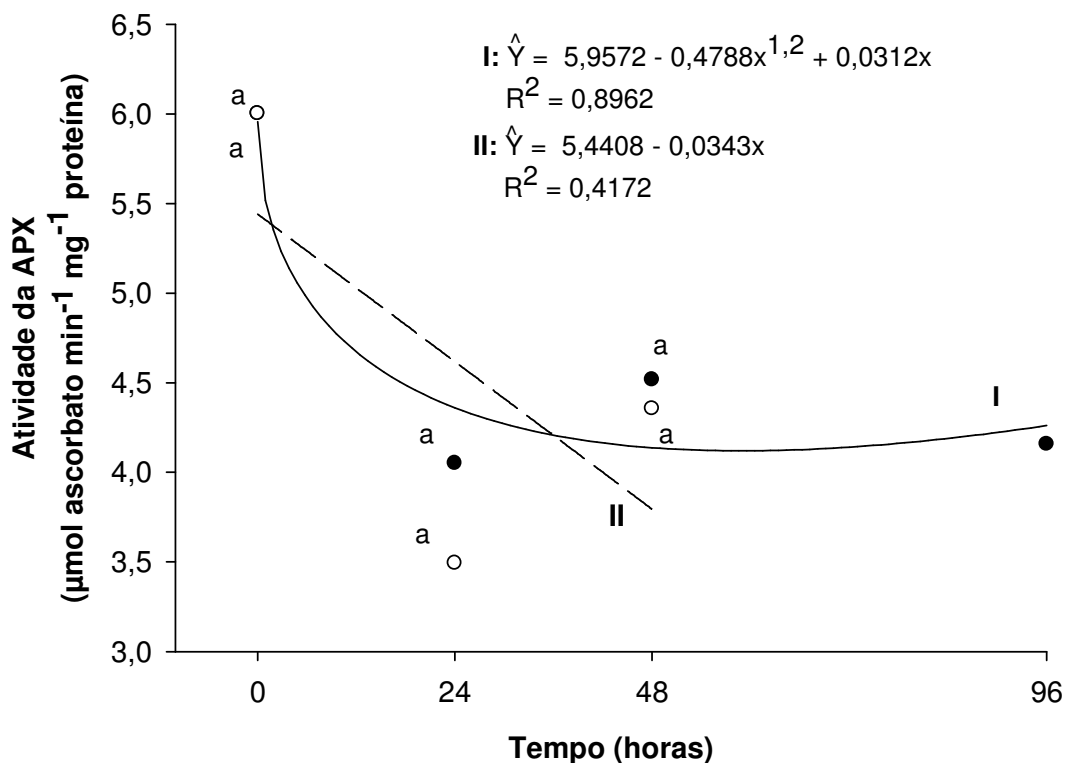
Figura 3 - Atividade da POD ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em inflorescências cortadas de *Epidendrum ibaguense* mantidas em água (—) e solução contendo 500 μM de SNP (---).

O aumento da atividade da POD nas flores mantidas em água (controle) ocorreu 48 horas após o início do tratamento e, nas flores tratadas com SNP, a atividade da POD passou de 0,44 para 0,74 $\mu\text{mol guaiacol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína até 48 horas após o tratamento, não diferindo do controle. A POD, juntamente com a CAT compõe o sistema de defesa das plantas removendo o H_2O_2 formado pela SOD. O H_2O_2 é removido pela CAT ou POD para impedir a formação do radical hidroxil, altamente reativo, através da reação de Haber-Weiss (FORNEY, 2003).

Em flores de *E. ibaguense*, o SNP não alterou a atividade da POD. Em tomate, o tratamento com 0,02 mM SNP promoveu ativação da POD durante o período avaliado (ZHAO et al., 2011). Em frutos de kiwi, o NO regulou a expressão das enzimas CAT, SOD e POD (ZHU et al., 2008). Possivelmente, a

não ativação da POD pelo SNP em *E. ibaguense* está relacionado à inibição da SOD, sugerindo que pouco H₂O₂ foi formado nas células.

Em inflorescências cortadas de *E. ibaguense* tratadas ou não com SNP, a atividade da APX foi maior no dia da colheita e se reduziu, de forma linear, ao longo do período de avaliação (Figura 4). Resultados semelhantes foram encontrados em flores de cravo mantidos em água ou solução contendo 0,1 mM de SNP (CHANG-LI et al., 2011).



Médias seguidas pela mesma letra, para o mesmo tempo de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 4 - Atividade da APX (µmol ascorbato min⁻¹ mg⁻¹ proteína) em inflorescências cortadas de *Epidendrum ibaguense* mantidas em água (—) e solução contendo 500 µM de SNP (---).

A APX, utilizando L-ascorbato como poder redutor, também é requerida para eliminar H₂O₂ das células sendo considerada indispensável para proteger cloroplastos e outros constituintes celulares de danos por H₂O₂ e radical OH⁻ produzido a partir dele (ASADA, 1992). A atividade dessa enzima pode ser

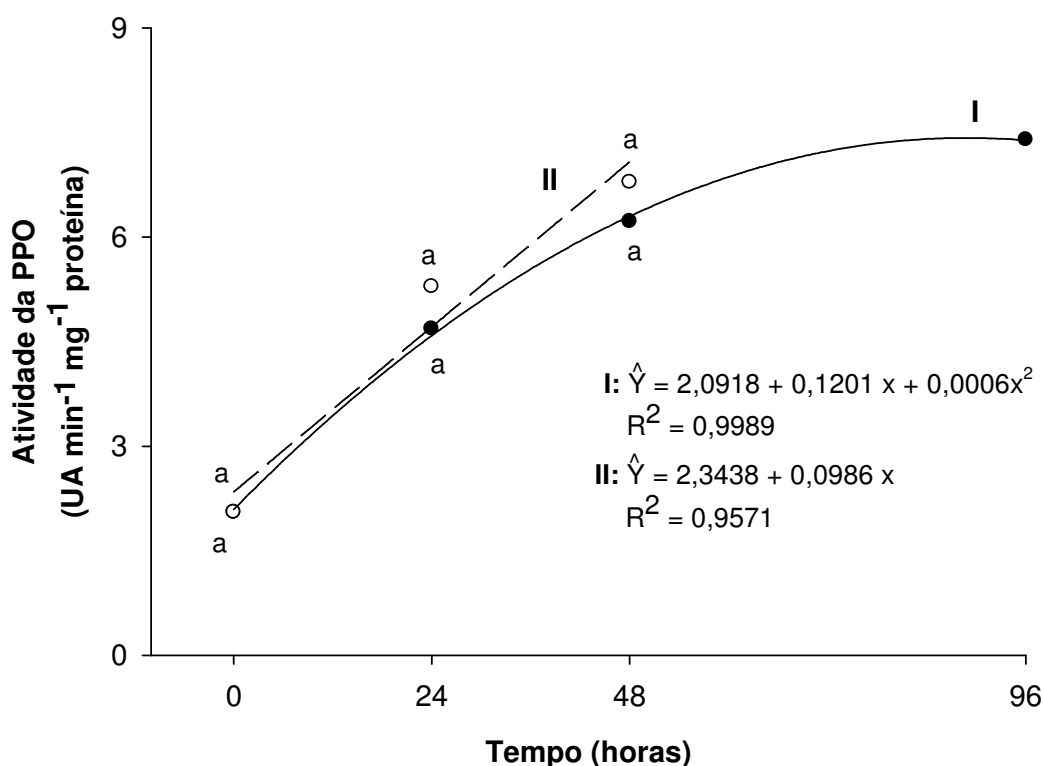
inibida sob condições de estresse, promovendo acúmulo de H_2O_2 (SCHUTZENDUBEL et al., 2001).

A atividade da APX não foi alterada pelo SNP em solução de condicionamento se comparada ao controle para o mesmo período de avaliação, mesmo observando-se menor atividade dessa enzima nas inflorescências tratadas com SNP 24 ou 48 horas após o tratamento. Em nêspas armazenadas a $1^\circ C$ e tratadas com cPTIO, a atividade da APX foi menor que em frutos controle (não tratados com cPTIO), mostrando que o NO pode ativar a APX em condições de estresse (XU et al., 2012). No entanto, os resultados obtidos nesse trabalho mostram que a ativação da APX pelo NO não ocorre em flores de *E. ibaguense* tratadas com solução contendo $500 \mu M$ de SNP.

A tendência da PPO em inflorescências tratadas ou não com SNP foi de aumento ao longo do período avaliado (Figura 5). Esses dados corroboram com os encontrados por Yang et al. (2010) em brotos de bambu tratados com SNP e por Huque et al. (2013) em maçãs minimamente processadas tratadas com 10 mg L^{-1} DETA/NO.

A atividade da PPO não diferiu entre as flores tratadas com SNP em solução de condicionamento e o controle, para o mesmo tempo de avaliação (Figura 5). A atividade média da PPO foi $5,0$ e $4,7 \text{ UA min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$ em flores mantidas em água ou solução de SNP, respectivamente.

A PPO, encontrada em muitos vegetais, está associada à pigmentação escura nos tecidos, relacionada à função de proteção (MARTINEZ; WHITAKER, 2000), uma vez que promove o escurecimento enzimático, catalisando a oxidação de mono e di-fenóis a o-quinonas (LICHANPORN et al., 2009). Em *Heliconia bihai* observou-se redução para a atividade da PPO ao longo do período de armazenamento, e esse decréscimo foi atribuído à diminuição de compostos fenólicos que atuam como substrato para as reações de escurecimento (GUIMARÃES, 2008). Segundo Amiot et al. (1995) a atividade dessa enzima pode variar entre espécies, maturidade e condições de armazenamento, bem como a composição de fenóis. Em maçãs minimamente processadas, o tratamento com DETA/NO promoveu inibição da PPO, comparado ao controle não tratado, com consequente inibição do escurecimento (HUQUE et al., 2013).



Médias seguidas pela mesma letra, para o mesmo tempo de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

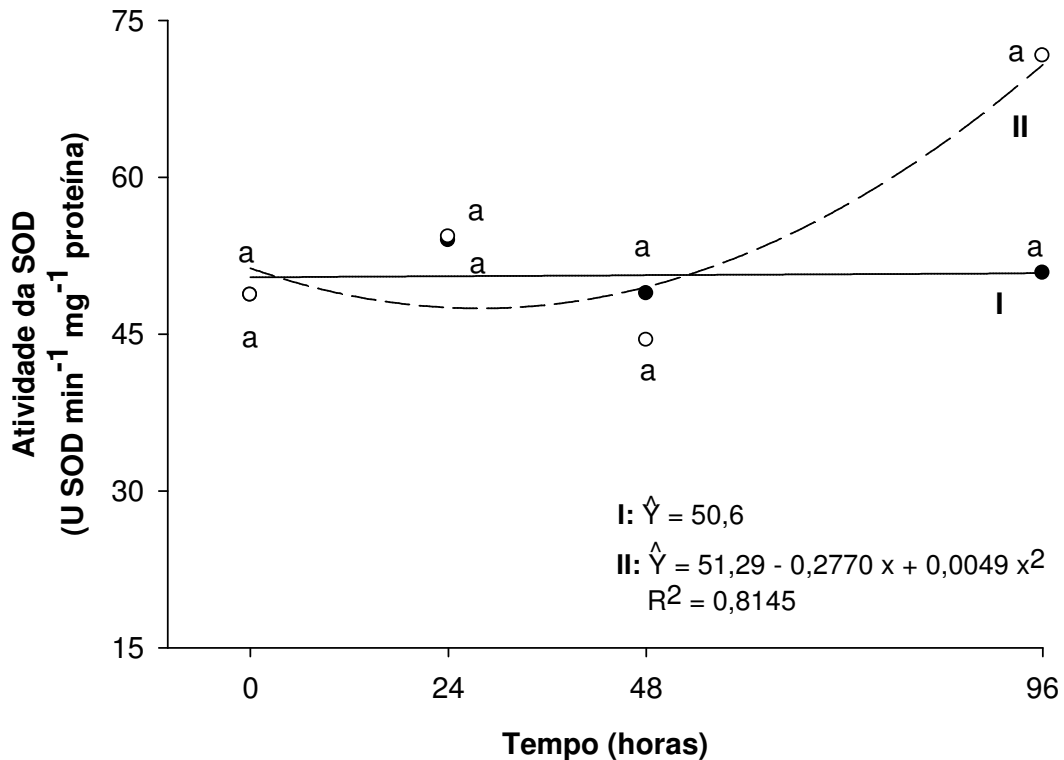
Figura 5 - Atividade da PPO (UA min⁻¹ mg⁻¹ proteína) em inflorescências cortadas de *Epidendrum ibaguense* mantidas em água (—) e solução contendo 500 μM de SNP (---).

3.2. Experimento II: inflorescências pulverizadas com solução de SNP

A atividade da SOD em flores de *E. ibaguense* mantidas em água apresentou comportamento linear ao longo do período avaliado (Figura 6). Em flores pulverizadas com SNP, a atividade média da SOD foi de 54,7 U SOD min⁻¹mg⁻¹proteína e a máxima de 71,6 U SOD min⁻¹mg⁻¹proteína, ocorrido 96 horas após o tratamento, no entanto, não diferiu do controle.

Nas flores pulverizadas com SNP, a ação do NO na atividade da SOD diferiu das flores tratadas com esse composto via solução de condicionamento visto que, quando fornecido diretamente às hastes, o SNP inibiu a atividade dessa enzima. A maior longevidade, observada nas flores pulverizadas com solução de SNP, pode estar relacionada à não inibição da atividade dessa

enzima conforme observado nas flores mantidas em solução de condicionamento com SNP.

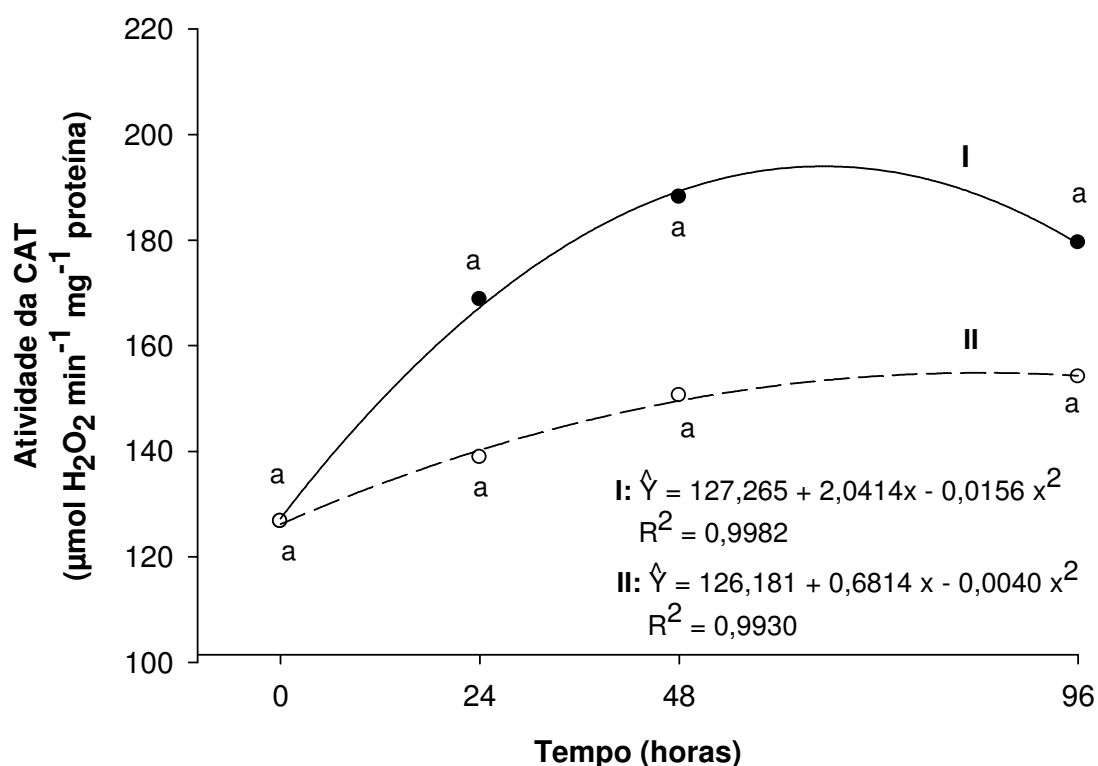


Médias seguidas pela mesma letra, para o mesmo tempo de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 6 - Atividade da SOD (U SOD min⁻¹ mg⁻¹ proteína) em inflorescências cortadas de *Epidendrum ibaguense* pulverizadas com água (—) e solução contendo 500 μM de SNP (---).

A atividade da CAT em flores pulverizadas com água (controle) ou SNP apresentou comportamento quadrático, não diferindo estatisticamente entre os tratamentos (Figura 7). Dados semelhantes foram obtidos em flores de crisântemos mantidos em água (CHAKRABARTY et al., 2007).

A atividade máxima da CAT foi 188 e 154 μmol H₂O₂ min⁻¹mg⁻¹proteína em flores pulverizadas com água ou solução de SNP, respectivamente (Figura 7). O tratamento por pulverização com solução contendo 500 μM de SNP resultou em menor atividade da CAT, no entanto, não diferiu estatisticamente do controle para o mesmo período de avaliação.

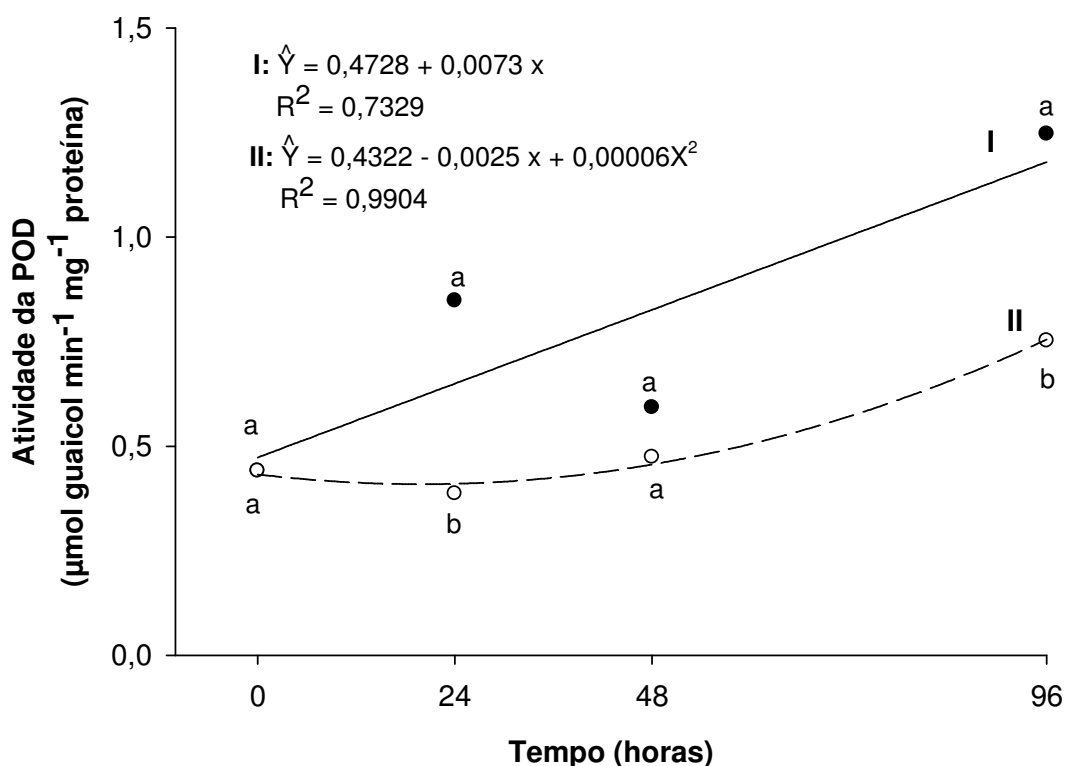


Médias seguidas pela mesma letra, para o mesmo tempo de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 7 - Atividade da CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína) em inflorescências cortadas de *Epidendrum ibaguense* pulverizadas com água (—) e solução contendo 500 μM de SNP (---).

Nas flores de *E. ibaguense*, observou-se aumento da POD ao longo do período avaliado tanto nas inflorescências controle quanto nas pulverizadas com SNP. Maior atividade da POD ($1,24 \mu\text{mol guaicol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína) foi observada em inflorescências pulverizadas com água após 96 horas do tratamento (Figura 8).

O NO aplicado via pulverização promoveu inibição da atividade dessa enzima tanto 24 quanto 96 horas após o tratamento. Em inflorescências pulverizadas com água (controle) a atividade da POD aumentou 180% até o final do armazenamento, já nas pulverizadas com SNP foi observado aumento de 70% no mesmo período. Isso significa que o NO em altas concentrações pode inibir a atividade de enzimas do sistema antioxidativo.



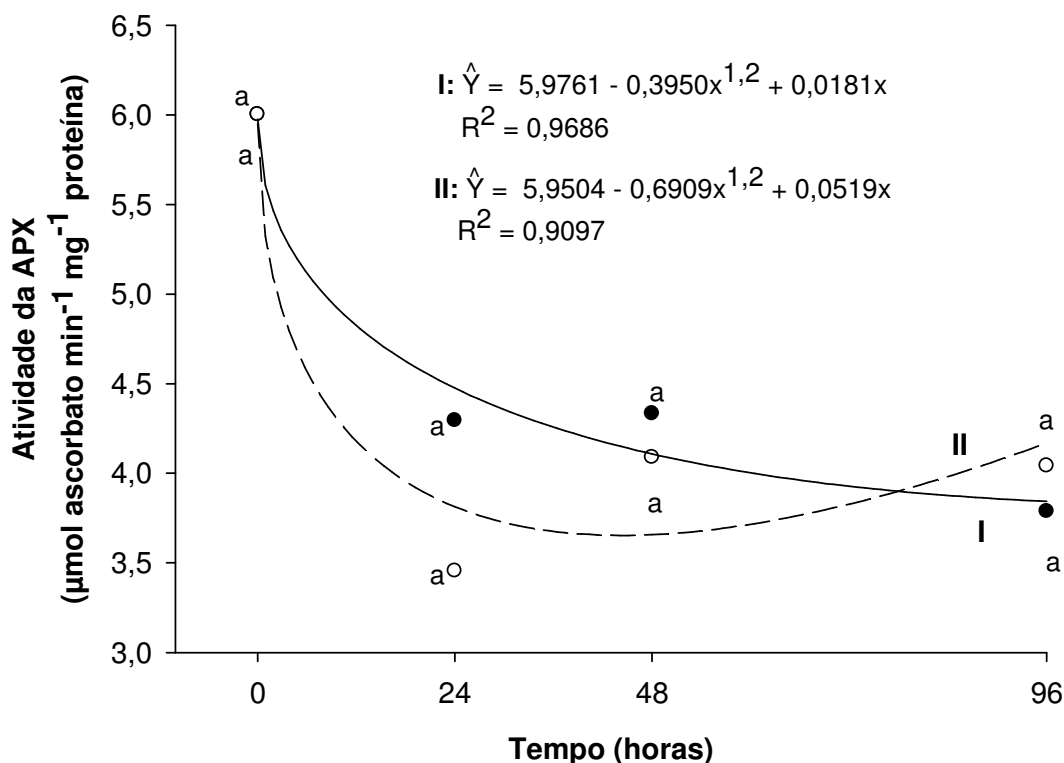
Médias seguidas pela mesma letra, para o mesmo tempo de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 8 - Atividade da POD ($\mu\text{mol guaicol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ prote\u00edna}$) em infloresc\u00eancias cortadas de *Epidendrum ibaguense* pulverizadas com \u00e1gua (—) e solu\u00e7\u00e3o contendo 500 μM de SNP (---).

Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que o efeito do SNP na atividade da POD pode variar conforme a esp\u00e9cie em estudo, a concentra\u00e7\u00e3o de SNP utilizada e o modo de aplica\u00e7\u00e3o, visto que a atividade dessa enzima n\u00e3o foi alterada em flores mantidas em solu\u00e7\u00e3o de condicionamento contendo SNP.

Em mudas de girassol foi observado decr\u00e9scimo de 12% na atividade da POD quando essas foram tratadas com 0,1 μM de SNP e aumento de 1, 4 e 10% quando as mudas foram tratadas com 10, 100 e 400 μM de SNP, respectivamente (SEL\u00c7UKCAN; CEVAHIR, 2008). J\u00e1, o tratamento com 0,1 mM de SNP resultou em ativa\u00e7\u00e3o da POD em flores de cravo, comparado ao controle mantido em \u00e1gua destilada (CHANG-LI et al., 2011).

A atividade da APX decresceu ao longo do período de avaliação tanto nas flores pulverizadas com água quanto nas pulverizadas com solução contendo SNP (Figura 9), conforme observado nas flores mantidas em solução de condicionamento contendo SNP ou água (Figura 4). A atividade média da APX foi 4,6 e 4,3 $\mu\text{mol ascorbato min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína em inflorescências pulverizadas com água (controle) e solução, respectivamente.



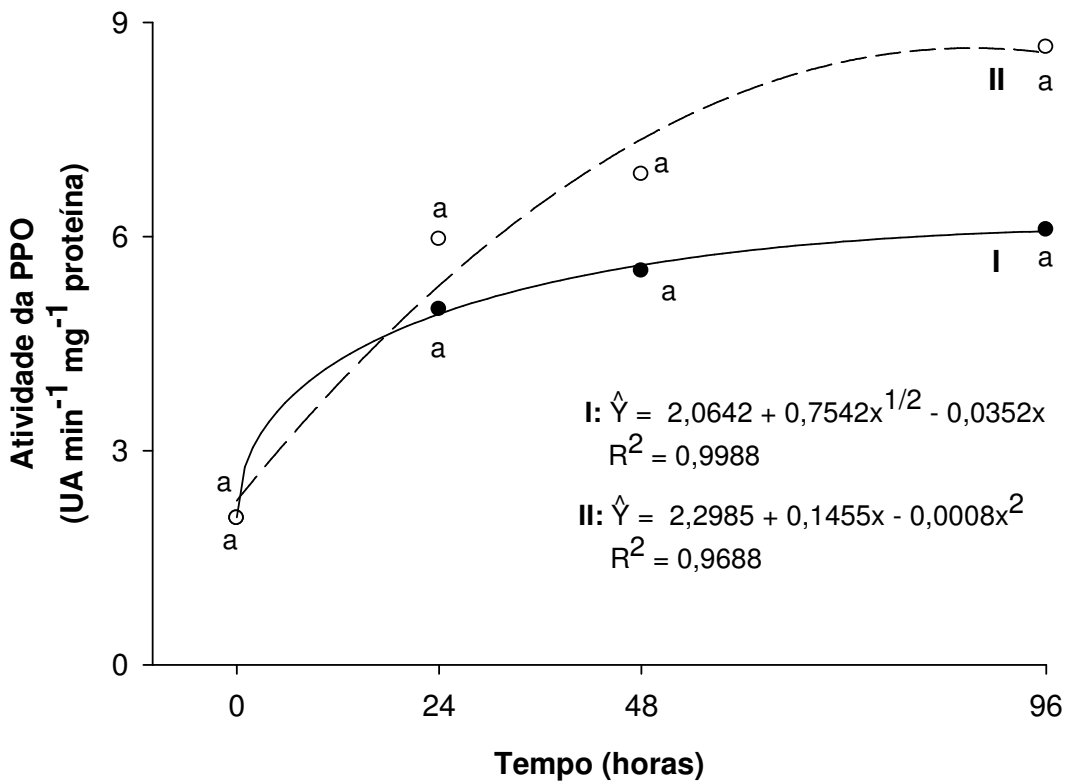
Médias seguidas pela mesma letra, para o mesmo tempo de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 9 - Atividade da APX ($\mu\text{mol ascorbato min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em inflorescências cortadas de *Epidendrum ibaguense* pulverizadas com água (—) e solução contendo 500 μM de SNP (---).

A atividade da APX não diferiu entre as flores pulverizadas com solução contendo 500 μM de SNP e o controle para o mesmo período de avaliação (Figura 9). Resultado similar foi observado em flores mantidas em solução de condicionamento contendo SNP. Já, frutos de pepino fumigados com 25 $\mu\text{L L}^{-1}$ de NO apresentaram melhoria no sistema antioxidativo observando-se aumentos significativos na atividade da APX e consequente

inibição do 'chilling' quando armazenados a 2°C (YANG et al., 2011). Em flores de cravo tratadas com solução contendo 0,1 mM de SNP foi observado aumento na atividade da APX em estádios mais avançados da vida de vaso (CHANG-LI et al., 2011).

A tendência da atividade da PPO foi de aumento ao longo do período avaliado com média de 4,65 e 5,88 UA min⁻¹ mg⁻¹ proteína e máxima de 6,09 e 8,65 em flores pulverizadas com água (controle) e solução de SNP, respectivamente. A atividade da PPO foi cerca de 40% maior, 96 horas após o tratamento, em flores pulverizadas com SNP, comparado ao controle, porém, não diferiu do controle (Figura 10).



Médias seguidas pela mesma letra, para o mesmo tempo de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 10 - Atividade da PPO (UA min⁻¹ mg⁻¹ proteína) em inflorescências cortadas de *Epidendrum ibaguense* pulverizadas com água (—) e solução contendo 500 µM de SNP (---).

A maior atividade da PPO 96 horas após o tratamento sugere uma possível ação desta enzima ao mecanismo de reparo do tecido danificado pelo NO em altas concentrações, embora não tenha sido verificada diferença estatística. Já, em brotos de bambu (*Phyllostachys violascens*) tratados com solução contendo 0,5 mM SNP foi verificada inibição da atividade da PPO e aumento na vida pós-colheita (YANG et al., 2010).

O NO foi identificado como agente inibidor da senescência, bem como da deterioração de flores e vegetais (TOIVONEN, 2003). Entretanto, conforme observado nesse trabalho, constata-se que altos níveis de NO presentes no tecido podem resultar em efeitos deletérios à planta, como toxidez ou inibição da atividades de enzimas do sistema antioxidativo. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o escurecimento do labelo, observado em flores de *E. ibaguense* tratadas com a solução de condicionamento, esteja relacionado com a inibição da atividade da SOD visto que, em flores pulverizadas com SNP, o NO não promoveu inibição da atividade dessa enzima e o escurecimento não foi observado. Sabe-se que o NO é um radical livre e pode formar peroxinitrito na presença de ânions superóxido, contudo, os danos provocados por esse composto em inflorescências cortadas de *E. ibaguense* podem estar relacionados à produção de ROS.

4. CONCLUSÕES

1. O SNP promoveu inibição da atividade da SOD em flores de *E. ibaguense* tratadas com 500 µM de SNP via solução de condicionamento e, consequente escurecimento do labelo, 48 após o tratamento.
2. O SNP aplicado sob pulverização promoveu inibição da atividade da POD 24 e 96 horas após a aplicação.
3. A atividade das enzimas CAT, APX e PPO não foi alterada pelo SNP.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIOT, M.J.; TACCHINI, M.; AUBERT S.Y.; OLESZEK W. Influence of cultivar, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 1132-1137, 1995.

ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation of chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, v. 109, p. 1247-1257, 1995.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, n. 2, p. 235-241, 1992.

BAVITA, A.; SHASHI, B.; NAVTEJ, S.B. Nitric oxide alleviates oxidative damage induced by high temperature stress in wheat. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 50, p. 372-378, 2012.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.

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

CHAKRABARTY, D.; CHATTERJEE, J.; DATTA S.K. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in chrysanthemum florets. **Plant Growth Regulation**, v. 53, n. 2, p. 107-115, 2007.

CHANG-LI Z.; LI L.; GUO-QUAN X.G. The physiological responses of carnation cut flowers to exogenous nitric oxide. **Scientia Horticulturae**, v. 127, p. 424-430, 2011.

CHEN, H.; SHEN, L.; YANG-LI-ZHE; FAN, B.; LUI, C.; SUN, J.; SHENG J. Effects of nitric oxide (NO) on postharvest rape quality and reactive oxygen species (ROS) metabolism related enzymes. **Food Science**, v. 28, n. 7, p. 493-496, 2007.

CONCELLÓN, A.; ANÓN, M.C.; CHAVES, A.R. Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature. **Food Chemistry**, v. 88, p. 17-24, 2004.

DEL LONGO A.T.; GONZÁLES, C.A.; PASTORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidant defenses under hyperoxigenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant and Cell Physiology**, v. 34, p, 1023-1028, 1993.

DEL RIO L.A.; CORPAS F.J.; BARROSO J.B. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. **Phytochemistry**, v. 65, p. 783-792, 2004.

FINGER, F.L.; MORAES, P.J.; MAPELI, A.M.; BARBOSA, J.G.; CECON, P.R. Longevity of *Epidendrum ibaguense* flowers as affected by pre-loading treatments and vase solution. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 83, n. 2, p. 144-147, 2008.

FORNEY, C.F. Postharvest response of horticultural products to ozone. In: HODGES, D.M. **Postharvest oxidative stress in horticultural crops**. New York: Food Products Press, 2003. p. 13-54.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

GUIMARÃES, A.A. **Manejo pós-colheita de hastes florais de *Heliconia bihai***. 2008. 159 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multipleforms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p, 450-455, 1987.

HUQUE, R.; WILLS, R.B.H.; PRISTIJONO, P.; GOLDING, J.B. Effect of nitric oxide (NO) and associated control treatments on the metabolism of fresh-cut apple slices in relation to development of surface browning. **Postharvest Biology and Technology**, v. 78, p. 16-23, 2013.

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

KAVRAYAN D.; AYDEMIR, T. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). **Food Chemistry**, v. 74, p. 146-154, 2001.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**, v. 34, p, 713-721, 1993.

LICHANPORN, I.; SRILAONG, V.; WONGS-AREE, C.; KANLAYANARAT, S. Postharvest physiology and browning of longkong (*Aglaia dookkoo* Griff.) fruit under ambient conditions. **Postharvest Biology and Technology**, v. 52, p. 294-299, 2009.

LURIE, S. Antioxidants. In: HODGES, D.M. **Postharvest oxidative stress in horticultural crops**. New York: Food Products Press, 2003. p. 131-150.

MARTINEZ, M.V.; WHITAKER, J.R. The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 6, p. 195-200, 2000.

MORAES, P.J. **Crescimento, caracterização da abertura floral e manejo pós-colheita de flores de *Epidendrum ibaguense* Kunth**. 2003. 125 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MORAES, P.J.; FINGER, F.L.; BARBOSA, J.G.; CECON, P.R. Longevidade pós-colheita da orquídea *Epidendrum ibaguense* Kunth. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 31-37, 2007.

MOURA, A.; MAPELI, A.M.; FINGER, F.L.; BARBOSA, J.G. Vida de vaso de inflorescências de *Epidendrum ibaguense* Kunth tratadas com inibidores de etileno. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 16, n. 2, p. 146-152, 2010.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880, 1981.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, p. 137-143, 1999.

SCHUTZENDUBEL A.; SCHWANZ, P.; TEICHMANN T.; GROSS K.; LANGENFELD-HEYSER, R.; GODBOLD, D.L.; POLLE, A. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. **Plant Physiology**, v. 127, n. 3, p. 887-898, 2001.

SELÇUKCAN, E.C.; CEVAHIR, O.G. Investigation on the relationship between senescence and nitric oxide in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 5, p. 1993-2004, 2008.

SIS, S.A.; MOSTOFI, Y.; BOOJAR, M.M.A.; KHALIGHI, A. Effect of nitric oxide on ethylene biosynthesis and antioxidant enzymes on Iranian peach (*Prunus persica* cv. Anjiri). **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 10, n. 2, p. 125-129, 2012.

SUN, B.; JING, Y.; CHEN, K.; SONG, L.; CHEN, F.; ZHANG, L.. Protective effect of nitric oxide on iron deficiency-induced oxidative stress in maize (*Zea mays*). **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 536-543, 2007.

TOIVONEN, P.M.A. Postharvest treatment to control oxidative stress in fruits and vegetables. In: HODGES, D.M. **Postharvest oxidative stress in horticultural crops**. New York: Food Products Press, 2003. p. 225-246.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. **SAEG - Sistema para Análises Estatísticas - versão 9.1**. Viçosa: UFV, 2007.

XU, M.; DONG, J.; ZHANG, M.; XU, X.; SUN, L. Cold-induced endogenous nitric oxide generation plays a role in chilling tolerance of loquat fruit during postharvest storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 65, p. 5-12, 2012.

YANG, H.; ZHOU, C.; WU, F.; CHENG, J. Effect of nitric oxide on browning and lignification of peeled bamboo shoots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 57, p. 72-76, 2010.

YANG, H.; WU, F.; CHENG, J. Reduced chilling injury in cucumber by nitric oxide and the antioxidant response. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 1237-1242, 2011.

YIN, J.; BAI, S.; WU, F.; LU, G.; YANG, H. Effect of nitric oxide on the activity of phenylalanine ammonia-lyase and antioxidative response in sweetpotato root in relation to wound-healing. **Postharvest Biology and Technology**, v. 74, p. 125-131, 2012.

ZHAO, R.; SHENG, J.; LV, S.; ZHENG, Y.; ZHANG, J.; YU, M.; SHEN L. Nitric oxide participates in the regulation of *LeCBF1* gene expression and improves cold tolerance in harvested tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 62, p. 121-126, 2011.

ZHU, S.; SUN, L.; LIU, M.; ZHOU, J. Effect of nitric oxide on reactive oxygen species and antioxidant enzymes in kiwifruit during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 1, p. 2324-2331, 2008.

CAPÍTULO 3

ATIVIDADE DA FENILALANINA AMÔNIA LIASE, ACÚMULO DE COMPOSTOS FENÓLICOS SOLÚVEIS E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM INFLORESCÊNCIAS DE *Epidendrum ibaguense* TRATADAS COM SNP

RESUMO: O uso de nitroprussiato de sódio (SNP), doador espontâneo de óxido nítrico (NO), em altas concentrações causa escurecimento do labelo e abscisão precoce de flores de *Epidendrum ibaguense*. O objetivo deste trabalho foi estudar a relação deste escurecimento com a atividade da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) e o teor de compostos fenólicos solúveis, bem como estudar os efeitos do SNP sobre a integridade das membranas celulares. Inflorescências cortadas de *E. ibaguense* foram tratadas com solução contendo 500 μM de SNP por 6 horas em vaso ou pulverizadas com a mesma solução até o completo molhamento, em diferentes experimentos, e o respectivo controle em água. Em seguida, as flores foram colocadas em vaso com água desionizada até o final da vida de vaso. Quando fornecido em solução de condicionamento o SNP promoveu ativação da PAL e não foram observadas diferenças no conteúdo de fenóis, extravasamento de eletrólitos e teores de aldeído malônico (MDA-TBA). Quando fornecido por pulverização, o SNP promoveu ativação da PAL 96 horas após o tratamento, aumento no conteúdo de fenóis 48 horas após o tratamento, aumento de 4% no extravasamento de eletrólitos 96 horas após tratamento, e aumento de 127% nos teores MDA-TBA, 72 horas após o tratamento, comparado ao controle pulverizado com água. O aumento na atividade da PAL em flores tratadas com SNP em solução de condicionamento foi relacionado ao mecanismo de defesa, no entanto, os compostos fenólicos não foram causa do escurecimento observado nas flores. A pequena variação nos teores de MDA-TBA e extravasamento de eletrólitos sugere que o NO não foi capaz de comprometer as membranas celulares. Ainda, o aumento nos teores de MDA-TBA em flores pulverizadas com SNP mostrou que o efeito do NO depende do modo de aplicação e, nesse caso, promoveu a peroxidação lipídica.

Palavras-chave: óxido nítrico, solução de condicionamento, pulverização, escurecimento.

ABSTRACT: The use of sodium nitroprusside (SNP), spontaneous nitric oxide donor, in high concentrations cause darkening of the labellum and abscission of flowers of *Epidendrum ibaguense*. This work aimed investigate the relationship of this darkening with the activity of enzyme phenylalanine ammonia lyase (PAL), accumulation of phenolic compounds soluble and study the effects of SNP on the integrity of cell membranes. Cut inflorescences of *Epidendrum ibaguense* were treated with solution containing 500 μM SNP in vase solution for six hours and sprayed with the same solution until complete wetting, in different experiments. Then, the inflorescences were maintained in vase containing desionized water until the end of vase life. The inflorescences kept in 500 μM SNP in conditioning solution showed activation of PAL and no differences were observed in phenolic content, electrolyte leakage and malondialdehyde levels (TBA-MDA). The inflorescences sprayed with SNP showed activation of PAL 96 hours after the treatment, increase in phenolic

content 48 hours treatment, increase of 4% in electrolyte leakage 96 hours after the treatment and increases in levels of 127 % MDA-TBA 72 hours after the treatment, compared with controls sprayed with water. The increase in PAL activity in flowers treated with SNP in conditioning solution may be related to defense mechanism, however, the phenolics compounds were not cause darkening observed in flowers. The small variation in concentration of TBA-MDA and electrolyte leakage suggest that nitric oxide was not able to damaging the cell membranes. The increased level of TBA-MDA in flowers sprayed with SNP showed that the effect of nitric oxide depends upon the mode of application and in this case promoted lipid peroxidation.

Key-words: nitric oxide, conditioning solution, sprayed, darkening.

1. INTRODUÇÃO

Epidendrum ibaguense Kunth (Orchidaceae) é uma planta terrestre que produz inflorescências durante praticamente todo o ano com considerável potencial para flor de corte. No Brasil há relatos de incidência dessa espécie em Minas Gerais, Roraima, Amapá, Amazonas, Pará e Rondônia (SUTTLEWORTH et al., 1991). Em virtude de suas propriedades fisiológicas, como as demais flores de corte, são consideradas produtos altamente perecíveis (PALIYATH et al., 2008). Segundo Finger et al. (2008) são flores altamente sensíveis ao etileno e a adoção de medidas para controle das perdas e manutenção da qualidade torna-se indispensável (MAPELI, 2009).

Inúmeros trabalhos têm demonstrado o efeito benéfico da adição de produtos químicos nas soluções de condicionamento das flores de corte e, o óxido nítrico tem sido testado visando retardar a senescência (CHANG-LI et al., 2011). Esse composto, exerce, possivelmente, o papel de proteção da célula contra o estresse oxidativo (YIN et al., 2012) ou regula a produção de etileno (MANJUNATHA et al., 2012). No entanto, o efeito do SNP, doador espontâneo de NO, em *E. ibaguense* parece ser dependente da concentração podendo, inclusive, inibir a atividade de enzimas do sistema antioxidativo quando utilizado em concentração muito alta, conforme observado no capítulo anterior. Adicionalmente, o uso de SNP causa escurecimento do labelo e abscisão precoce das flores de *E. ibaguense* (VIEIRA et al., 2012). Sabe-se que o NO, apesar de possuir efeito protetor nas células, é um radical livre e pode formar peroxinitrito na presença de ânions superóxido, levando à injúria em proteínas

ligadas à membrana (TOIVONEN, 2003). Em maçãs minimamente processadas o NO reduziu o conteúdo de fenóis, inibiu a atividade da fenilalanina amônia liase (PAL, EC 4.3.1.5), reduziu o extravasamento de íons, porém, não alterou os níveis de etileno e a peroxidação lipídica estimada pela produção de aldeído malônico (MDA) (HUQUE et al., 2013).

A PAL é uma enzima chave e regulatória da rota biossintética dos fenilpropanóides, catalisando a desaminação do aminoácido L-fenilalanina em ácido transcinâmico, sendo esse o primeiro passo para a biossíntese dos fenólicos, metabólitos secundários produzidos pelas plantas em resposta a condições de estresse (TAIZ; ZEIGER, 2006). Devido à natureza e função dos fenilpropanóides, a atividade e ativação da PAL em condições de estresse têm sido consideradas como parte de um mecanismo de defesa (OHL et al., 1990).

Os compostos fenólicos, pelo fato de serem facilmente oxidáveis, podem provocar escurecimento em plantas (CHOEHOM et al., 2004). O ácido transcinâmico, por exemplo, produzido na rota dos fenilpropanóides, pode ser convertido a compostos fenólicos que podem servir como substrato para as reações de escurecimento (NGUYEN et al., 2003).

O estresse oxidativo, gerado pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) pode provocar danos às proteínas, levando à diversas alterações na função celular, e uma das consequências é a peroxidação lipídica que pode ser considerada uma das maiores características da senescência de plantas (HODGES, 2003). A peroxidação lipídica é definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, resultando na formação de hidroperóxidos lipídeos e aldeídos como o aldeído malônico que pode ser detectado em amostras biológicas e utilizado para se avaliar o estresse oxidativo (LIMA; ABDALLA, 2001).

O objetivo deste trabalho foi estudar a relação entre o escurecimento do labelo de flores de *E. ibaguense* provocado pelo tratamento com SNP e a atividade da enzima PAL, teor de compostos fenólicos solúveis e, adicionalmente, estudar os efeitos do NO sobre a integridade das membranas celulares.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As plantas de *Epidendrum ibaguense* foram cultivadas no campo de produção do Setor de Floricultura da Universidade Federal de Viçosa – MG (20°45' latitude sul, 45°51' longitude oeste; altitude de 642 m). As hastes foram colhidas entre 7 e 8 horas no estágio 10 de abertura floral (mais da metade do número de botões florais da inflorescência abertos), conforme estabelecido por Moraes (2003).

Após a colheita as hastes foram colocadas em baldes contendo água e levadas ao laboratório, onde foi feito o corte na base da haste em água e a padronização do comprimento para 25 cm.

Após a padronização, as hastes foram distribuídas ao acaso e tratadas com solução contendo 500 µM de SNP em dois modos de aplicação: solução de condicionamento (“pulsing”) ou pulverização. O respectivo controle foi tratado com água. As hastes tratadas com SNP em solução de condicionamento foram mantidas em vasos com 400 mL da solução por 6 horas e, inflorescências tratadas com SNP via pulverização, foram pulverizadas até o completo molhamento com aproximadamente 15 mL de solução.

Após o tratamento, as hastes foram mantidas em vaso contendo 400 mL de água desionizada até o final da longevidade. Foi considerado como fim da longevidade quando as inflorescências apresentavam mais de 50% de abscisão ou murcha das flores (MORAES et al., 2007). A troca da água do vaso e o corte a 2 cm na base da haste foram feitos a cada dois dias. Os experimentos foram conduzidos à temperatura de 25°C, umidade relativa de 50-70% e iluminação constante (7-10 µmol m⁻² s⁻¹).

Antes do tratamento e 24, 48 e 96 horas após, determinou-se a atividade da PAL, o teor de compostos fenólicos solúveis, o extravasamento de eletrólitos e a concentração do complexo MDA-TBA.

Utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso com cinco repetições. Os dados foram interpretados por meio da análise de variância e regressão utilizando o Sistema de Análises Estatísticas (SAEG), versão 9.1 (UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV, 2007). As médias referentes aos tratamentos qualitativos foram comparadas por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores obtidos a partir de tratamentos quantitativos

foram submetidos à análise de regressão, sendo o modelo escolhido com base no coeficiente de determinação, no desvio-padrão dos coeficientes de regressão e no fenômeno biológico.

2.1. Determinação da atividade da PAL (EC 4.3.1.5)

O extrato bruto para determinação da atividade da enzima foi obtido em 0,5 g de massa fresca de flores retiradas ao acaso e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para posterior análise e mantidas em freezer horizontal a -20°C.

No momento da análise o material vegetal foi triturado em politron juntamente com 2 mL de tampão borato a 0,1 M pH 8,8 contendo β -mercaptoetanol a 5 mM, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 2 mM, e PVP a 10% (p/v). Em seguida, esse homogeneizado foi filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado a 12.000 g por 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade da PAL (JIANG; JOYCE, 2003). Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram realizadas a 4 °C.

A atividade da enzima foi determinada em 0,1 mL do extrato que, juntamente com 2,9 mL de L-fenilalanina a 60 mM em tampão borato a 0,1 M pH 8,8, foram incubados por 1 hora a 40°C. Após esse período a reação foi paralisada com a adição de 0,1 mL de HCl a 6N. As leituras no espectrofotômetro foram realizadas antes e após a incubação, a 290 nm. A atividade da PAL foi expressa em $\Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína. A concentração de proteínas nas amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando soro albumina como padrão.

2.2. Determinação do teor de compostos fenólicos solúveis

O teor de compostos fenólicos solúveis foi obtido de 0,2 g de massa fresca de flores, retiradas ao acaso e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para posterior análise e mantidas em freezer horizontal a -20°C.

No momento da análise, o material vegetal congelado foi triturado em politron juntamente com 4 mL de metanol. O homogeneizado foi centrifugado a 14.000 g por 15 minutos e sobrenadante foi utilizado para determinação do teor

de compostos fenólicos solúveis. A 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado 2,5 mL de Folin-Ciocalteu (diluído 1:3) e, posteriormente, 2 mL de carbonato de sódio anidro a 10%. Em seguida, procedeu-se a agitação dos tubos e os mesmos foram mantidos no escuro por 1 hora. Posteriormente, realizou-se a centrifugação a 14.000 g por 5 minutos. As leituras no espectrofotômetro foram realizadas a 700 nm e a concentração de compostos fenólicos solúveis foi expressa em mg de D-Catequina g⁻¹ matéria fresca. A curva de calibração foi feita usando D-Catequina como padrão (PRINCE; BUTLER, 1977).

2.3. Determinação do extravasamento de eletrólitos

Foram coletadas ao acaso 0,2 g de flores, cortados ao meio e lavadas em água desionizada. Posteriormente, as partes florais foram colocadas em tubos plásticos com tampa rosqueada contendo 25 mL de água desionizada, os quais foram mantidos a 25°C por duas horas, sob agitação. Após esse período foi mensurada a condutividade inicial, seguido de armazenamento a -20°C durante 24 horas. Após o período de congelamento, as amostras foram colocadas em banho de água em ebulição durante 25 minutos. Em seguida, os tubos foram colocados novamente, sob agitação, a 25°C, até a estabilização da temperatura, mensurando-se, então, a condutividade total. O extravasamento de eletrólitos foi calculado em percentagem de eletrólitos extravasados no início em relação ao total após o congelamento das amostras (WHITLOW et al., 1992).

2.4. Determinação da concentração de MDA-TBA

Foram coletados ao acaso 0,2 g de massa fresca de flores que foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para posterior análise e mantidas em freezer horizontal a -20°C.

No momento da análise, o material vegetal congelado foi triturado em politron juntamente com 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1% (p/v) até a completa homogeneização. Em seguida, esse homogeneizado foi filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado a 12.000 g por 15 minutos, e o

sobrenadante foi utilizado para determinação da concentração de MDA-TBA. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram realizadas a 4°C.

Alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante foram adicionadas a 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,5% (p/v) em TCA a 20% (p/v) e os tubos foram incubados em banho-maria a 90°C por 20 minutos. Após esse período, a reação foi paralisada transferindo-se os tubos para banho de gelo. Posteriormente, procedeu-se nova centrifugação a 3.000 g por 4 minutos. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 532 nm. A absorbância inespecífica a 600 nm foi medida e subtraída das amostras.

A concentração de MDA-TBA foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade do aldeído malônico de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expressa em nmol aldeído malônico g^{-1} massa fresca (HEATH; PACKER, 1968).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

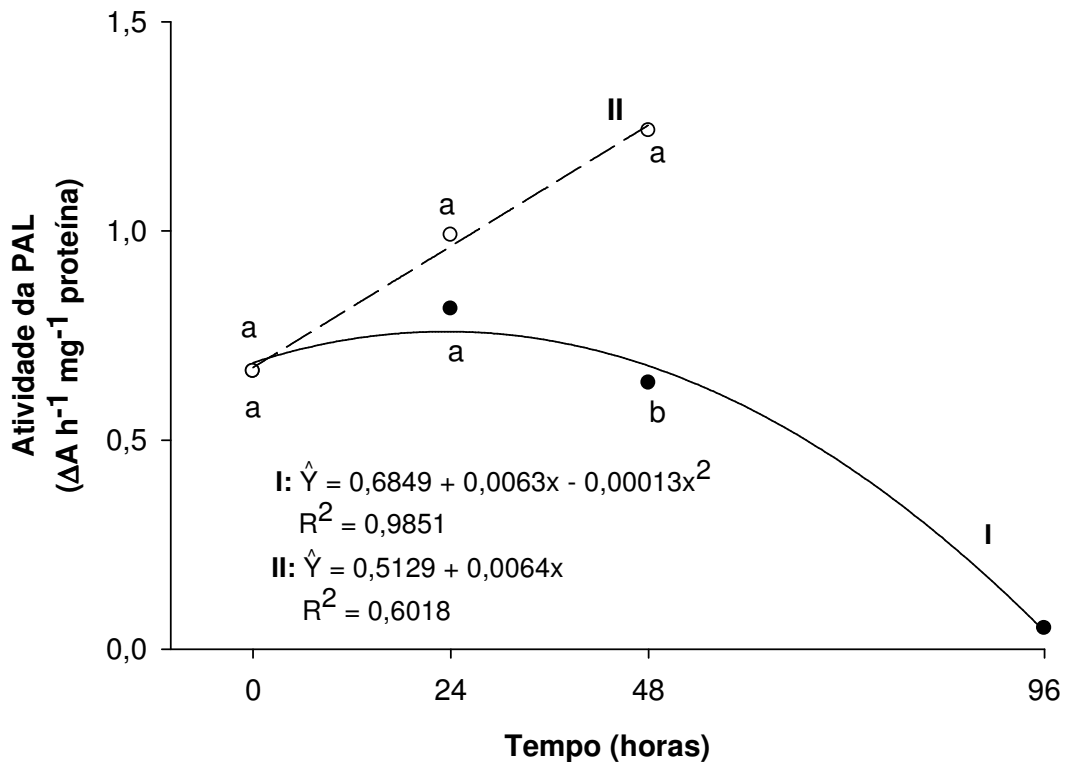
3.1. Experimento I: inflorescências tratadas com SNP em solução de condicionamento

As inflorescências mantidas em água (controle) apresentaram atividade média da PAL de $0,54 \Delta\text{A h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína e redução ao longo do período avaliado (Figura 1). As inflorescências mantidas em solução contendo $500 \mu\text{M}$ de SNP apresentaram atividade média da PAL de $0,96 \Delta\text{A h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína e, diferente do controle, apresentaram aumento na atividade dessa enzima ao longo do período avaliado.

A atividade da PAL varia, dentre outras coisas, com a idade da planta ou quando ocorre algum dano, ainda, em um dado tecido, os níveis da PAL podem variar significativamente em intervalos de tempo relativamente curtos (CAMM; TOWERS, 1973).

A atividade da PAL em inflorescências tratadas com SNP em solução de condicionamento diferiu estatisticamente do controle 48 horas após o tratamento, sendo 94% maior. Segundo Silva et al. (2012), a ativação da PAL ocorre sob condições de estresse. Ainda, em pós-colheita, o aumento na expressão gênica com conseqüente estímulo à atividade da PAL foi observado

em condições de dano (VAN DOORN; CRUZ, 2000). Em folhas de alface submetidas ao dano mecânico a atividade da PAL aumenta, bem como o escurecimento (SALTVEIT, 2004).



Médias seguidas pela mesma letra, para o mesmo tempo de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

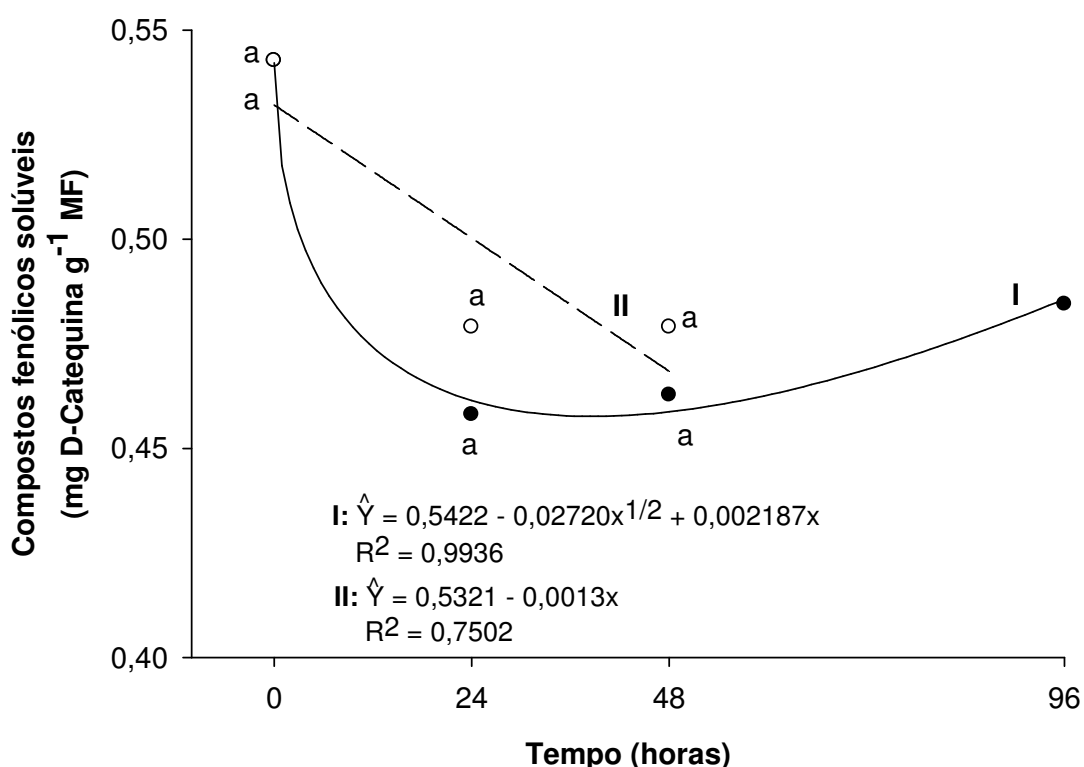
Figura 1 - Atividade da PAL ($\Delta A h^{-1} mg^{-1}$ proteína) em inflorescências cortadas de *Epidendrum ibaguense* mantidas em água (—) e solução contendo 500 μM de SNP (---).

O aumento da atividade da PAL pode ser considerado um marcador bioquímico de defesa das plantas contra o estresse, dado que esta enzima é necessária para a síntese de compostos fenólicos associada com mecanismos de defesa (NADERNEJAD et al., 2012). A PAL converte fenilalanina a mono e di-fenóis que são substratos para a polifenoloxidase (PPO) (NGUYEN et al., 2003).

A ativação da PAL em flores de *E. ibaguense* tratadas com SNP em solução de condicionamento pode estar associada ao mecanismo de defesa da

espécie em estudo, em função do escurecimento verificado no labelo. Em folhas de alface submetidas ao dano mecânico, o escurecimento foi relacionado ao aumento no teor de compostos fenólicos (SALTVEIT, 2004).

O teor de compostos fenólicos solúveis nas inflorescências controle reduziu 15% até 24 horas, e posteriormente apresentou aumento até 96 horas (Figura 2). Nas inflorescências mantidas em solução contendo 500 μM de SNP o teor de fenóis reduziu 12% nas primeiras 24 horas, não diferindo do controle para o mesmo tempo de avaliação. O teor médio de fenóis foi de 0,48 e 0,50 mg D-Catequina g^{-1} MF nas inflorescências mantidas em água e solução de SNP respectivamente.



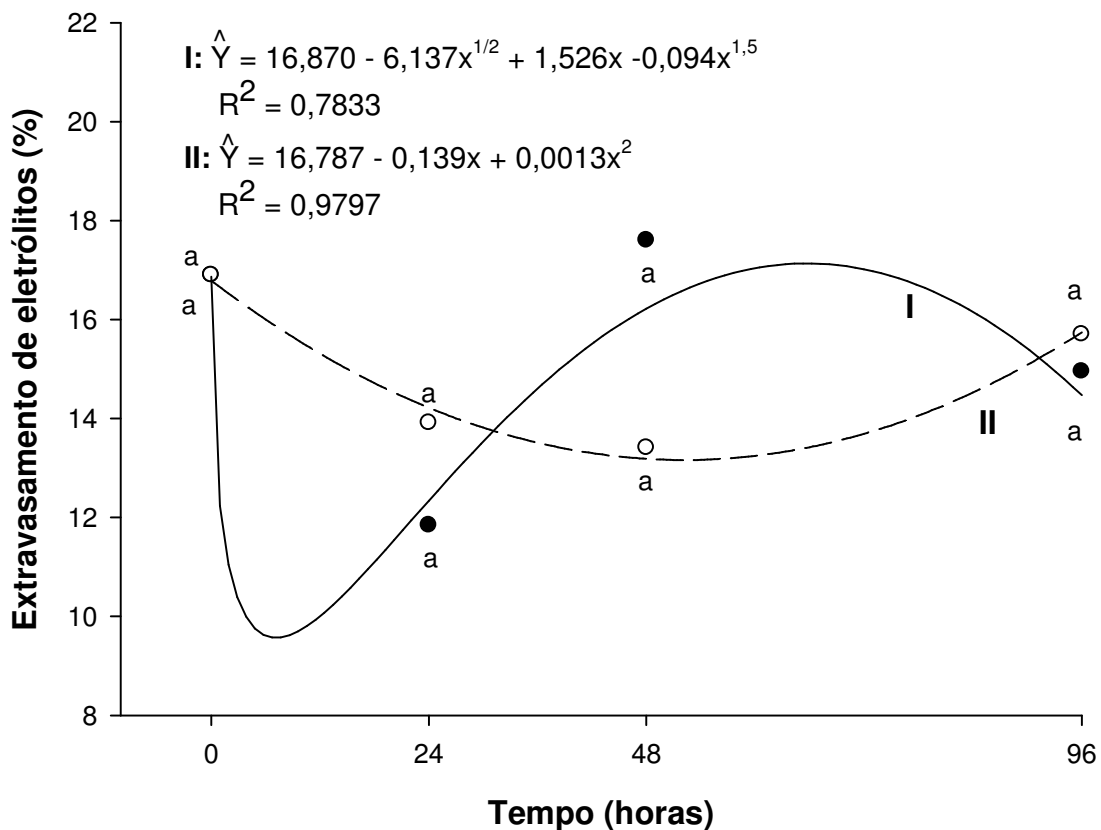
Médias seguidas pela mesma letra, para o mesmo tempo de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 2 - Teor de compostos fenólicos solúveis (mg D-Catequina g^{-1} MF) em inflorescências cortadas de *Epidendrum ibaguense* mantidas em água (—) e solução contendo 500 μM de SNP (---).

Em brotos de bambu, 0,5 mM de SNP causou inibição da atividade da PAL e aumento no conteúdo de fenóis, associado à redução do escurecimento

(YANG et al., 2010). O tratamento com 0,5 mM de SNP promoveu ativação da PAL e aumento no conteúdo de fenóis em raízes de batata-doce, suficiente para promover a cicatrização de feridas ocorridas durante a colheita (YIN et al., 2012).

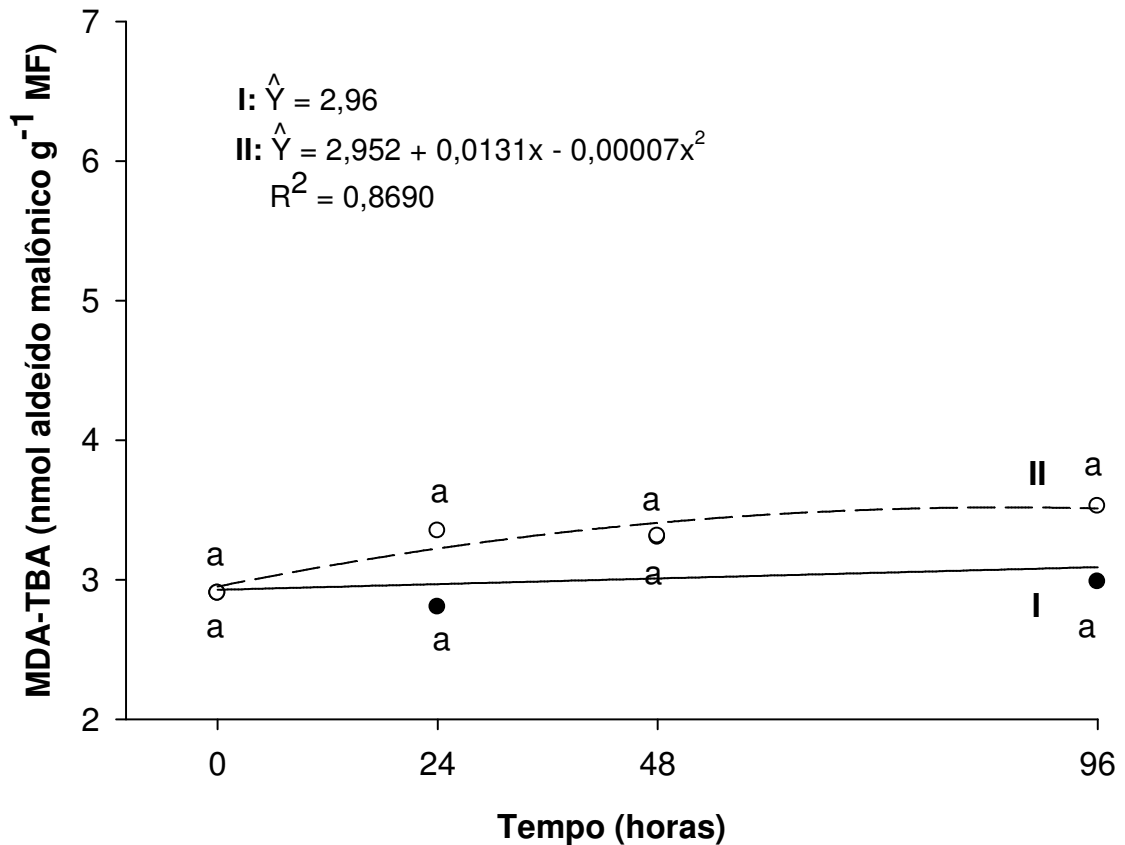
O extravasamento de eletrólitos variou de 11 a 17% em inflorescências mantidas em água e de 13 a 16% em inflorescências mantidas em solução de SNP (Figura 3). O extravasamento médio foi de 15% tanto em inflorescências mantidas em água quanto em solução de SNP. Nas inflorescências mantidas em água, o extravasamento de eletrólitos se reduziu nas primeiras 24 horas e posteriormente apresentou aumento à semelhança das inflorescências mantidas em solução contendo SNP.



Médias seguidas pela mesma letra, para o mesmo tempo de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 3 - Extravasamento de eletrólitos em inflorescências cortadas de *Epidendrum ibaguense* mantidas em água (—) e solução contendo 500 µM de SNP (---).

Os teores de MDA-TBA não foram alterados nas flores mantidas em solução de SNP em solução de condicionamento, comparado ao controle mantido em água (Figura 4). Esses resultados sugerem que 500 μM de SNP em solução de condicionamento por 6 horas não provoca peroxidação lipídica. O teor médio de MDA-TBA foi de 2,96 e 3,20 nmol g^{-1} MF em flores mantidas em água e solução de SNP, respectivamente.



Médias seguidas pela mesma letra, para o mesmo tempo de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

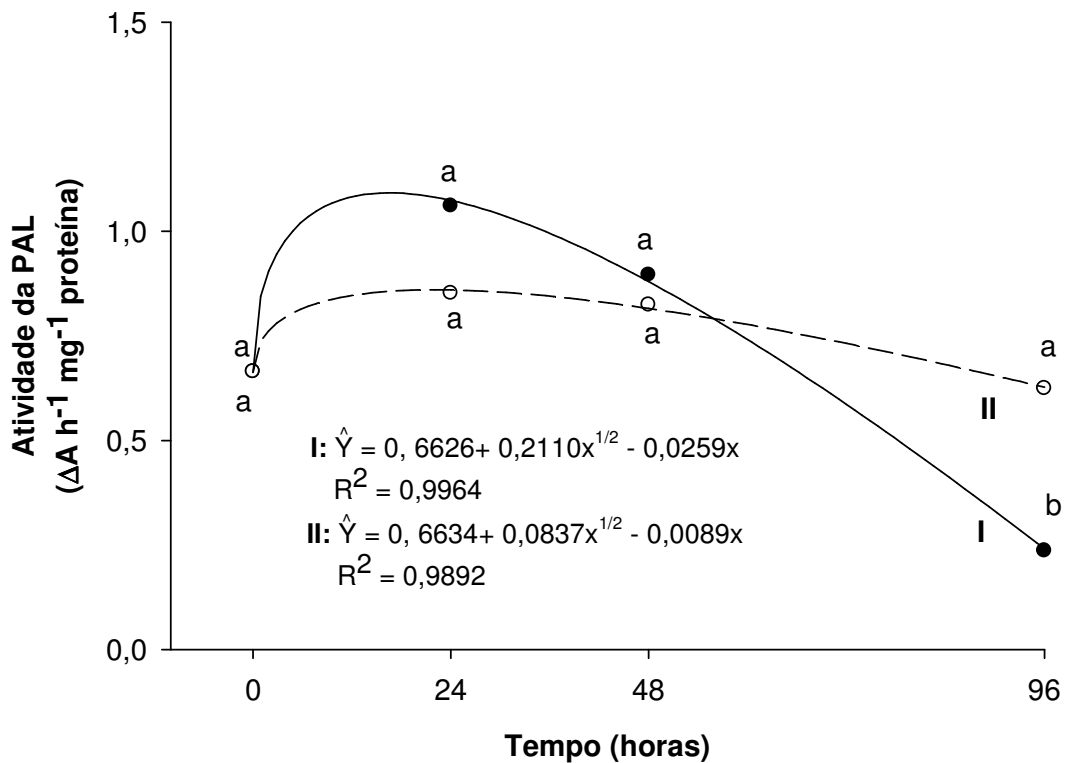
Figura 4 - Teor de MDA-TBA em inflorescências cortadas de *Epidendrum ibaguense* mantidas em água (—) e solução contendo 500 μM de SNP (---).

Em flores de cravo tratadas com 0,1 mM SNP foi observada redução nos teores de MDA comparado ao controle não tratado com SNP e aumento ao longo da vida de vaso, mostrando o efeito protetor do SNP (CHANG-LI et al., 2011). Possivelmente, o escurecimento do labelo observado em inflorescências tratadas com 500 μM de SNP em solução de condicionamento não está

relacionado com a peroxidação lipídica ou com o extravasamento de eletrólitos. No presente estudo foi observada pequena variação nos teores de MDA-TBA e extravasamento de eletrólitos sugerindo que o NO parece não ter sido capaz, nesse caso, de comprometer as membranas celulares.

3.2. Experimento II: inflorescências pulverizadas com solução de SNP

A atividade da PAL em inflorescências pulverizadas com água (controle) ou solução de SNP reduziu ao longo do período avaliado (Figura 5). Comportamento semelhante foi observado nas inflorescências mantidas em água.

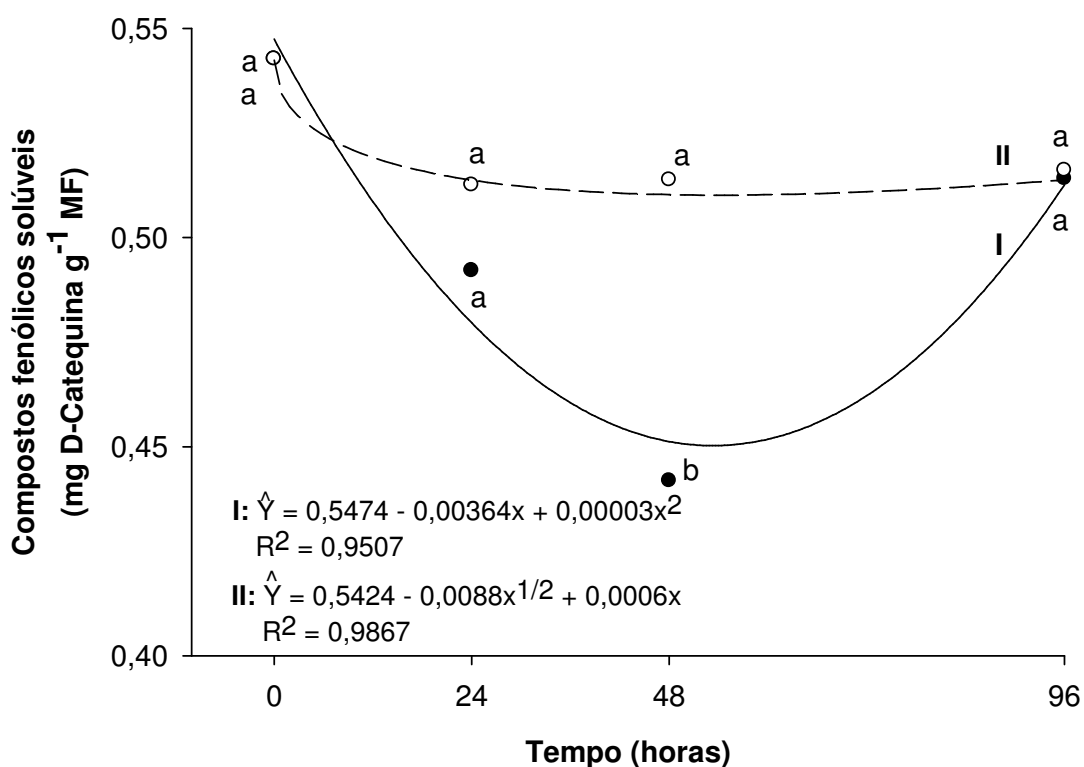


Médias seguidas pela mesma letra, para o mesmo tempo de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 5 - Atividade da PAL ($\Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$) em inflorescências cortadas de *Epidendrum ibaguense* pulverizadas com água (—) e solução contendo 500 μM de SNP (---).

As inflorescências pulverizadas com SNP apresentaram maior atividade da PAL, comparado ao controle, 96 horas após o tratamento. A atividade média da PAL foi de 0,71 e 0,74 $\Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína em inflorescências pulverizadas com água e solução de SNP, respectivamente. A queda na atividade da PAL ao longo do período de armazenamento também foi observada em frutos de nêspersas (*Eriobotrya japonica* L.) até o 6º dia (CAO et al., 2008). Em raízes de batata-doce submetidas ao dano mecânico e tratadas ou não com 0,5 mM SNP foi observado aumento na atividade da PAL ao longo do armazenamento (YIN et al., 2012).

Nas inflorescências pulverizadas com água (controle) o teor de fenóis reduziu 18% nas primeiras 48 horas e apresentou aumento de 14% de 48 até 96 horas (Figura 6). O teor médio de compostos fenólicos solúveis foi de 0,49 mg D-Catequina g^{-1} MF.



Médias seguidas pela mesma letra, para o mesmo tempo de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 6 - Teor de compostos fenólicos solúveis (mg D-Catequina g^{-1} MF) em inflorescências cortadas de *Epidendrum ibaguense* pulverizadas com água (—) e solução contendo 500 μM de SNP (---).

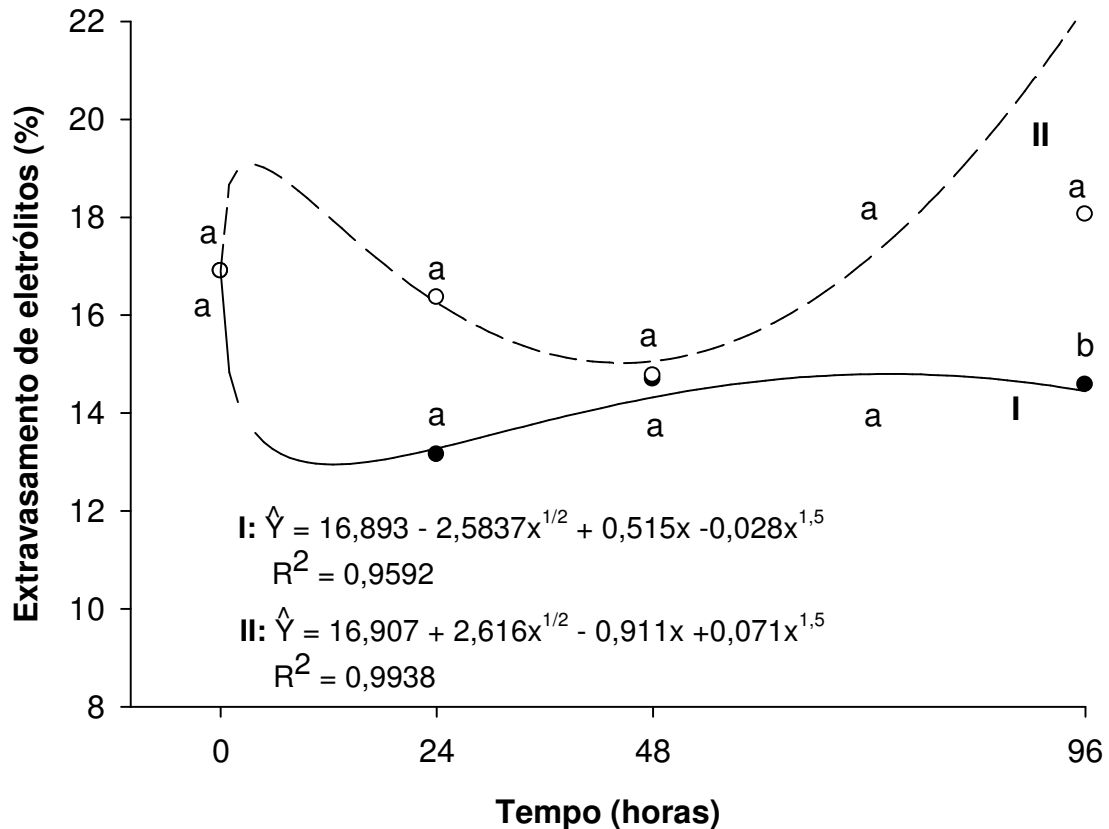
As inflorescências pulverizadas com SNP apresentaram menor variação no teor de fenóis quando comparadas com o tratamento controle. Foi observada redução de 5% nas primeiras 24 horas e estabilização até 96 horas. O teor médio de fenóis nessas inflorescências foi de 0,52 mg D-Catequina g⁻¹ MF. Decorridas 48 horas da pulverização com SNP, o teor de fenóis nas flores foi menor que no controle. De maneira similar, em maçãs minimamente processadas, o NO promoveu redução no conteúdo de fenóis (HUQUE et al., 2013). Em flores, folhas e frutos de pistache foi observada correlação positiva entre a atividade da PAL e o conteúdo de compostos fenólicos (NADERNEJAD et al., 2012).

As ROS podem provocar a peroxidação lipídica e o concomitante aumento no extravasamento de íons associado com a senescência (LURIE, 2003). Nas inflorescências de *E. ibaguense* pulverizadas com água o extravasamento de eletrólitos foi máximo no início do período de avaliação, enquanto nas inflorescências pulverizadas com solução de SNP foi observado aumento ao final do período, diferindo do controle (Figura 7). O extravasamento de eletrólitos variou de 13 a 16% e de 14 a 18% em inflorescências pulverizadas com água e solução de SNP, respectivamente. Em maçãs minimamente processadas, o NO inibiu o extravasamento de íons (HUQUE et al., 2013).

Inflorescências pulverizadas com água apresentaram aumento nos teores de MDA-TBA e posterior queda ao longo do período avaliado, semelhante ao apresentado por inflorescências mantidas em solução de SNP (Figura 8).

O incremento nos teores de MDA-TBA foi observado em inflorescências pulverizadas com solução contendo 500 µM de SNP ao longo do período avaliado (Figura 8). Até 72 horas após o tratamento com SNP as inflorescências apresentaram aumento de 127% nos teores de MDA-TBA, enquanto as inflorescências pulverizadas com água apresentaram aumento de, no máximo, 33%. Similarmente ao observado neste trabalho, frutos de kiwi tratados com solução aquosa contendo 2 µmol L⁻¹ de NO apresentaram teor de MDA superior ao observado em frutos tratados com 1 µmol L⁻¹ de NO, sugerindo um aumento na peroxidação lipídica nos frutos tratados com maior concentração de NO (ZHU et al., 2008). Já, raízes de batata-doce tratadas com

0,5 mM de SNP apresentaram redução nos teores de MDA, comparado ao controle não tratado (YIN et al., 2012). Em maçãs minimamente processadas o NO não alterou a peroxidação lipídica estimada pela produção de MDA (HUQUE et al., 2013).

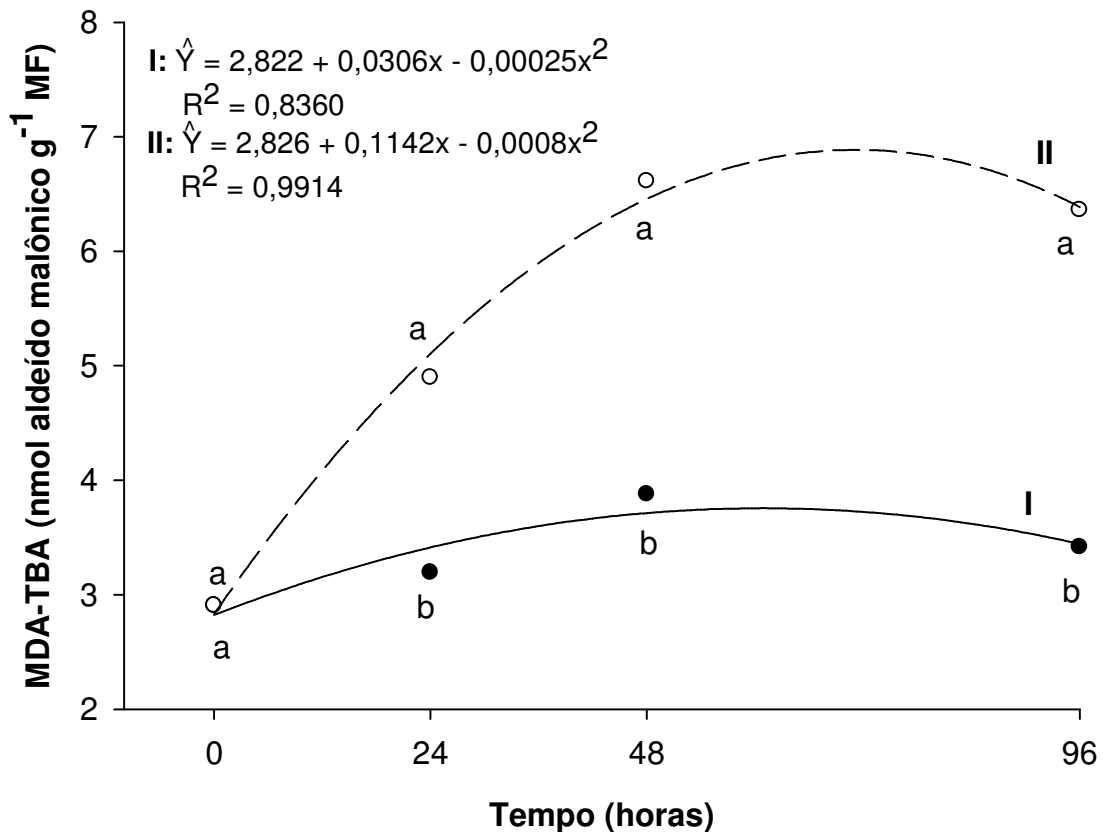


Médias seguidas pela mesma letra, para o mesmo tempo de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 7 - Extravasamento de eletrólitos em inflorescências cortadas de *Epidendrum ibaguense* pulverizadas com água (—) e solução contendo 500 µM de SNP (----).

O aumento nos teores de MDA-TBA em inflorescências pulverizadas com solução de SNP indica a ocorrência de danos às membranas celulares devido à peroxidação de ácidos graxos insaturados (MONTILLET et al., 2005). Segundo Corpas et al. (2010) altas concentrações de NO podem provocar múltiplos danos a diferentes componentes celulares como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Ainda, segundo Lester (2003) o estresse oxidativo é

considerado agente direto na degradação autocatalítica de lipídeos, e se H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$ formados nas células não forem catabolizados podem, eventualmente, serem transformados em ROS induzindo a peroxidação lipídica.



Médias seguidas pela mesma letra, para o mesmo tempo de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 8 - Teor de MDA-TBA em inflorescências cortadas de *Epidendrum ibaguense* pulverizadas com água (—) e solução contendo 500 μ M de SNP (---).

Os resultados de peroxidação lipídica e extravasamento de eletrólitos nas inflorescências tratadas com SNP comprovam que o efeito do NO está relacionado ao modo de aplicação. Possivelmente, a aplicação por pulverização é mais danosa às membranas celulares provocando o aumento na peroxidação lipídica e o concomitante aumento no extravasamento de eletrólitos 72 horas após a pulverização. Segundo Corpas et al. (2010), o tempo de vida do NO é relativamente curto e, por isso, como com a pulverização o NO é aplicado diretamente à flor, material avaliado, os efeitos

podem ser mais danosos às membranas em relação à aplicação via solução de condicionamento.

Com esse estudo observou-se comportamento diferente entre as flores tratadas com SNP em solução de vaso ou via pulverização, com destaque para a atividade da PAL e teor de MDA-TBA. Nas flores tratadas com 500 μM de SNP em solução de condicionamento ocorreu ativação da PAL, o que não ocorreu nas flores pulverizadas. Com isso, sugere-se que o SNP seja mais danoso ao sistema antioxidativo quando fornecido em solução de vaso por ser facilmente absorvido via xilema e posteriormente translocado. Adicionalmente, a ativação da PAL pode estar relacionada à menor longevidade e ao escurecimento ocorrido no labelo de flores tratadas com SNP em solução de condicionamento. Em flores pulverizadas com 500 μM de SNP ocorreu significativo aumento nos teores de MDA-TBA comparado ao controle, o que não ocorreu nas flores mantidas em solução de condicionamento contendo SNP. Esses resultados sugerem que o uso de altas concentrações de SNP via pulverização provoca peroxidação lipídica e, conseqüentemente, danos a membranas celulares. Assim, o uso de altas concentrações de SNP em *E. ibaguense* provoca diferentes danos em função do modo de aplicação e não deve ser recomendado em pós-colheita desta espécie.

4. CONCLUSÕES

1. O efeito do SNP na atividade da PAL, conteúdo de compostos fenólicos, extravasamento de eletrólitos e teores de MDA-TBA variou de acordo com a forma de aplicação.
2. Em flores tratadas com SNP em solução de condicionamento foi observado ativação da PAL e não foram observadas diferenças nos teores de MDA-TBA e extravasamento de eletrólitos, comparado ao controle em água.
3. Em flores pulverizadas com SNP ocorreu ativação da PAL, aumento no extravasamento de eletrólitos após 96 horas do tratamento e aumento nos teores de MDA-TBA comparado ao controle.

4. O teor de fenóis não diferiu em flores tratadas com SNP em solução de condicionamento e foi maior após 48 horas do tratamento em flores pulverizadas com SNP.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CAMM, E.L.; TOWERS, G.H.N. Phenylalanine ammonia lyase. **Phytochemistry**, v.12, n. 5, p. 961-973, 1973.

CAO, S.; ZHENG, Y.; YANG, Z.; TANG, S.; JIN, P.; WANG, K.; WANG, X. Effect of methyl jasmonate on the inhibition of *Colletotrichum acutatum* infection in loquat fruit and the possible mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, n. 2, p. 301-307, 2008.

CHANG-LI Z.; LI L.; GUO-QUAN X.G. The physiological responses of carnation cut flowers to exogenous nitric oxide. **Scientia Horticulturae**, v. 127, p. 424-430, 2011.

CHOEHOM, R.; KETSA S.; VAN DOORN W.G. Senescent spotting of banana peel is inhibited by modified atmosphere packaging. **Postharvest Biology and Technology**, v. 31, p. 167-175, 2004.

CORPAS, F.J.; PALMA, J.M.; LETERRIER, M.; DEL RÍO, R.A.; BARROSO, J.B. Nitric oxide and abiotic stress in higher plants. In: HAYAT, S.; MORI, M.; PICHTEL J.; AHMAD, A. (Eds.). **Nitric oxide in plant physiology**. Weinheim: Wiley-Blackwell. 2010. p. 51-64.

FINGER, F.L.; MORAES, P.J.; MAPELI, A.M.; BARBOSA, J.G.; CECON, P.R. Longevity of *Epidendrum ibaguense* flowers as affected by pre-loading treatments and vase solution. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 83, n. 2, p. 144-147, 2008.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p. 189-198, 1968.

HODGES, D.M. Oxidative stress and postharvest produce. In: Hodges, D.M. (Ed.). **Postharvest oxidative stress in horticultural crops**. New York: Food Products Press. 2003. p. 1-12.

HUQUE, R.; WILLS, R.B.H.; PRISTIJONO, P.; GOLDING, J.B. Effect of nitric oxide (NO) and associated control treatments on the metabolism of fresh-cut apple slices in relation to development of surface browning. **Postharvest Biology and Technology**, v. 78, p. 16-23, 2013.

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.

LESTER, G.E. Oxidative stress affecting fruit senescence. In: HODGES, D.M. (Ed.). **Postharvest oxidative stress in horticultural crops**. New York: Food Products Press, 2003. p. 113-129.

LIMA, E.L.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LURIE, S. Antioxidants. In: HODGES, D.M. (Ed.). **Postharvest oxidative stress in horticultural crops**. New York: Food Products Press, 2003. p. 131-150.

MANJUNATHA G.; GUPTA, K.J.; LOKESH, V.; MUR, L.A.J.; NEELWARNE, B. Nitric oxide counters ethylene effects on ripening fruits. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 4, p. 476-483, 2012.

MAPELI, A.M. **Influência de substâncias preservativas, anti-etilênicas e da refrigeração na conservação pós-colheita de flores de *Epidendrum ibaguense* Kunth (Orchidaceae)**. 2009. 106 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MONTILLET J.; CHAMNONGPOL S.; RUSTÉRUCCI C.; DAT J.; COTTE, B.; AGNEL, J.; BATESTI, C.; INZÉ, D.; BREUSEGEM F.V.; TRIANTAPHYLIDES, C. Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution hypersensitive cell death in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 138, n. 3, p. 1516-1526, 2005.

MORAES, P.J. **Crescimento, caracterização da abertura floral e manejo pós-colheita de flores de *Epidendrum ibaguense* Kunth**. 2003. 125 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MORAES, P.J.; FINGER, F.L.; BARBOSA, J.G.; CECON, P.R. Longevidade pós-colheita da orquídea *Epidendrum ibaguense* Kunth. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 31-37, 2007.

NADERNEJAD, N.; AHMADIMOGHADAM, A.; HOSSEINIFARD, J.; POURSEYEDI, S. Phenylalanine ammonia-lyase activity, total phenolic and flavonoid content in flowers, leaves, hulls and kernels of three pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars. **American-Eurasian Journal Agricultural & Environmental Sciences**, v. 12, n. 6, p. 807-814, 2012.

NGUYEN, T.B.T.; KETSA, S.; VAN DOORN, W.G. Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 30, p. 187-193, 2003.

OHL, S.; HEDRICK S.A.; CHORY, J.; LAMB, C.J. Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 2, p. 837-848, 1990.

PALIYATH, G.; MURR, D.P.; HANDA, A.K.; LURIE, S. Postharvest biology and technology: an international perspective. In: PALIYATH, G.; MURR, D.P.; HANDA, A.K.; LURIE, S. (Eds.). **Postharvest biology and technology of fruits, vegetables, and flowers**. Ames: Wiley-Blackwell, 2008. p. 1-7.

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.

SALTVEIT, M.E. Effect of 1-methylcyclopropene on phenylpropanoid metabolism, the accumulation of phenolic compounds, and browning of whole and fresh-cut 'iceberg' lettuce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 34, p. 74-80, 2004

SILVA, R.R.; CÂMARA, C.A.G.; ALMEIDA, A.V.; RAMOS, C.S. Biotic and abiotic stress-induced phenylpropanoids in leaves of the Mango (*Mangifera indica* L., Anacardiaceae). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 2, p. 206-211, 2012.

SUTTLEWORTH, F.S.; ZIM, H.S.; DILLON, G.W. **Orquídeas, guia dos orquídeófilos**. 3.ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1991. 158 p.

TAIZ, L.; ZEIGER E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

TOIVONEN, P.M.A. Postharvest treatment to control oxidative stress in fruit and vegetables. In: HODGES, D.M. (Ed.). **Postharvest oxidative stress in horticultural crops**. New York: Food Products Press, 2003. p. 225-246.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. **SAEG - Sistema para Análises Estatísticas - versão 9.1**. Viçosa: UFV, 2007.

VAN DOORN, W.G.; CRUZ, P. Evidence for a wounding-induced xylem occlusion stems of cut chrysanthemum flowers. **Postharvest Biology and Technology**, v. 19, p. 73-83, 2000.

VIEIRA, L.M.; PEREIRA, A.M.; MENDES, T.D.C.; FINGER, F.L. Longevity of *Epidendrum ibaguense* Kunth treated with nitric oxide. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON POSTHARVEST QUALITY OF ORNAMENTAL PLANTS, 10, 2012, Porto de Galinhas, PE. **Book...** Porto de Galinhas, 2001. p. 79.

WHITLOW, T.H.; BASSUK, N.L.; RANNEY, T.G.; REICHERT, D.L. An improved method for using electrolyte leakage to assess membrane competence in plant tissues. **Plant Physiology**, v. 98, p. 198-205, 1992.

YANG, H.; ZHOU, C.; WU, F.; CHENG, J. Effect of nitric oxide on browning and lignification of peeled bamboo shoots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 57, p. 72-76, 2010.

YIN, J.; BAI, S.; WU, F.; LU, G.; YANG, H. Effect of nitric oxide on the activity of phenylalanine ammonia-lyase and antioxidative response in sweetpotato root in relation to wound-healing. **Postharvest Biology and Technology**, v. 74, p. 125-131, 2012.

ZHU, S.; SUN, L.; LIU, M.; ZHOU, J. Effect of nitric oxide on reactive oxygen species and antioxidant enzymes in kiwifruit during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 1, p. 2324-2331, 2008.

CONCLUSÕES GERAIS

1. Os efeitos promovidos pelo nitroprussiato de sódio (SNP) em inflorescências cortadas de *Epidendrum ibaguense* Kunth variaram de acordo com o modo de aplicação.
2. Não foram observadas diferenças na longevidade das inflorescências quando tratadas com SNP até 100 μM , independente do modo de aplicação.
3. Alta concentração de SNP (500 μM) em solução de condicionamento promoveu aumento da abscisão, acelerou o senescência das flores e provocou escurecimento do labelo 48 horas após o tratamento.
4. O tratamento das inflorescências de *E. ibaguense* com 500 μM de SNP em solução de condicionamento promoveu ativação das enzimas dismutase do superóxido e fenilalanina amônia liase (PAL).
5. Em inflorescências de *E. ibaguense* pulverizadas com 500 μM de SNP foi observado inibição da peroxidase, ativação da PAL e aumento na concentração de compostos fenólicos solúveis, extravasamento de eletrólitos e teores de aldeído-malônico.
6. A atividade das enzimas catalase, peroxidase do ascorbato e polifenoloxidase não foi alterada pelo SNP, independente do modo de aplicação.