

## Notas Científicas

### Compostos salicilados e tolerância de nêspas ao frio

Fernando Kazuhiro Edagi<sup>(1)</sup>, Ivan Sestari<sup>(1)</sup>, Fabiana Fumi Sasaki<sup>(1)</sup>,  
Felipe de Angelis Monteiro Terra<sup>(1)</sup> e Ricardo Alfredo Kluge<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Ciências Biológicas, Avenida Pádua Dias, nº 11, CEP 13418-900 Piracicaba, SP. E-mail: fedagi@agrofresh.com, isestari@usp.br, fsasaki@esalq.usp.br, faterra@esalq.usp.br, rkluge@esalq.usp.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de compostos salicilados sobre a tolerância de nêspas ao frio e verificar se este efeito está relacionado à modulação de enzimas do metabolismo secundário. Nêspas foram imersas em água (controle) ou em soluções que continham ácido salicílico (1 ou 10 mmol L<sup>-1</sup>), ou foram expostas a 0,05 mmol L<sup>-1</sup> de metil salicilato, antes de serem armazenadas a 1°C por 60 dias. A inibição da atividade da fenilalanina amônia-liase, peroxidase e polifenoloxidase, pelo metil salicilato, aumenta a tolerância de nêspas ao frio, o que torna possível estender o armazenamento dos frutos por até dois meses a 1°C.

Termos para indexação: *Eriobotrya japonica*, compostos salicilados, escurecimento interno.

### Salicylates compounds and the loquat fruit tolerance to chilling

Abstract – The objective of this work was to evaluate the effect of the application of salicylate compounds on loquat fruit tolerance to chilling and to verify whether this effect is related to modulation of secondary metabolism enzymes. Loquat fruit were immersed in water (control) or in solutions containing 1 or 10 mmol L<sup>-1</sup> salicylic acid, or they were treated with 0.05 mmol L<sup>-1</sup> methyl salicylate before storage at 1°C for 60 days. The inhibition of the phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenoloxidase enzyme activity by methyl salicylate, increases the loquat fruit tolerance to cold, which makes it possible to extend fruit storage period for up to two months at 1°C.

Index terms: *Eriobotrya japonica*, salicylate compounds, internal browning.

A refrigeração constitui a principal estratégia empregada para estender a vida de prateleira de frutos após a colheita. No entanto, o uso desta tecnologia é limitado para grande parte dos frutos de origem tropical, que não toleram temperaturas inferiores a 10°C. Em nêspas, (*Eriobotrya japonica* Lindl.), o estresse desencadeado pelo frio pode ocasionar o enrijecimento e o escurecimento interno da polpa e também aumentar a suscetibilidade aos fungos (Cai et al., 2006; Edagi et al., 2009). O aparecimento desses danos deprecia a qualidade e resulta em sérias implicações à comercialização e aceitação dos frutos pelos consumidores. Por esta razão, diversos tratamentos têm sido testados para evitar ou diminuir o aparecimento desses danos em nêspas e outras espécies sensíveis ao frio (Cai et al., 2006; Edagi et al., 2009, 2010; Sestari et al., 2010).

Embora haja estudos que indicam que o ácido jasmônico e as poliaminas podem reduzir o impacto de diferentes tipos de estresse em plantas, outros reguladores vegetais ainda permanecem pouco explorados (Wang et al., 2006). Já foi demonstrado que o acúmulo de ácido salicílico nos tecidos danificados de plantas é necessário para a

indução de mecanismos de defesa contra agentes bióticos. Recentemente, foi sugerido que o ácido salicílico também pode aumentar a tolerância de plântulas e de frutos ao frio (Kang et al., 2003; Wang et al., 2006). Embora esses estudos atribuam a maior tolerância ao frio ao acúmulo de proteínas de choque térmico e à elevação da atividade antioxidante, ainda se desconhece o mecanismo de tolerância ao frio mediado pelos compostos salicilados.

O objetivo deste trabalho foi verificar se a aplicação de compostos salicilados pode aumentar a tolerância de nêspas ao frio e se este efeito está relacionado à modulação da atividade de enzimas do metabolismo secundário.

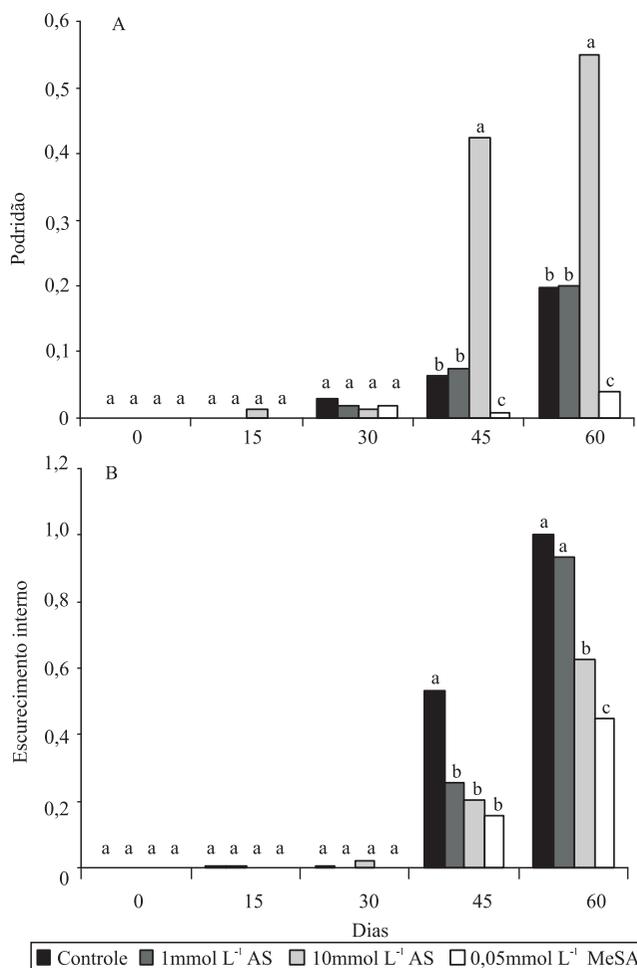
Frutos da cultivar Fukuhara de nêspas foram colhidos em região produtora do estado de São Paulo, selecionados e divididos aleatoriamente em quatro lotes de frutos, aos quais foram aplicados os seguintes tratamentos: imersão em água destilada durante 5 min (controle), imersão em solução a 1 ou 10 mmol L<sup>-1</sup> de ácido salicílico durante 5 min e exposição a 0,05 mmol L<sup>-1</sup> de metil salicilato por 16 horas. A temperatura do ar e das soluções de imersão foi de 20°C. Após os tratamentos, os frutos

foram acondicionados em embalagens de tereftalato de polietileno (PET), embalados com filme de policloreto de vinila (PVC) com espessura de 14  $\mu\text{m}$  e armazenados por 60 dias a  $1\pm 0,5^\circ\text{C}$ , com  $90\pm 5\%$  de umidade relativa do ar.

Os índices de escurecimento interno e de frutos podres foram determinados de acordo com a área da superfície afetada: 0, ausente; 1,  $<5\%$ ; 2,  $5\text{--}25\%$ ; 3,  $25\text{--}50\%$ ; e 4,  $>50\%$ . Ambos os índices foram calculados por meio da fórmula: Índice = ( $\Sigma$  notas x número de frutos afetados) / ( $4 \times$  total de frutos da amostra). As atividades específicas das enzimas fenilalanina amônia-liase, peroxidase e polifenoloxidase foram determinadas segundo Edagi et al. (2009). Para a extração da fenilalanina amônia-liase, 2 g de polpa foram macerados com tampão borato a  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ . O homogeneizado foi centrifugado a  $10.000 \text{ g}$  por 20 min, a  $4^\circ\text{C}$  e filtrado em lã de vidro para formar o extrato. Adicionou-se, então, 1 mL de tampão borato a  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  a 1 mL de extrato. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria a  $36^\circ\text{C}$ , durante 5 min. Foi adicionado 1 mL de fenilalanina ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ), e os tubos foram incubados em banho-maria, a  $36^\circ\text{C}$ , durante 1 hora. A reação foi parada, tendo-se adicionado HCl 6 N. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em 290 nm. Para a extração da polifenoloxidase e peroxidase, 2 g de polpa foram macerados com tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6), e o homogeneizado foi centrifugado a  $10.000 \text{ g}$  durante 15 min, a  $4^\circ\text{C}$ . Para mensurar a atividade da polifenoloxidase, foi adicionado 0,5 mL de solução de pirocatecol ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) a 1,5 mL de extrato e 1 mL de tampão fosfato de sódio. Após 2 min a  $25^\circ\text{C}$ , as leituras foram realizadas em espectrofotômetro em 410 nm. Para a quantificação da atividade da peroxidase, foi adicionado 0,5 mL de solução a 1 mL do extrato que continha  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio e tampão fosfato ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  e pH 6,7), além de solução a  $4 \text{ mmol L}^{-1}$  de aminoantipirina e  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de pirocatecol. A solução foi incubada em banho-maria a  $30^\circ\text{C}$ , durante 5 min. A reação enzimática foi interrompida com álcool etílico. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em 505 nm. A atividade das três enzimas foi expressa em unidades (U) por grama de polpa, em que 1 U corresponde ao aumento de 0,01 na absorbância por minuto. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 4 repetições de 12 frutos. Os dados com a distribuição binomial foram transformados pela fórmula arco seno  $(x/100)^{0,5}$ , para serem normalizados. Os dados obtidos com distribuição

normal, juntamente com os dados transformados, foram submetidos à ANOVA, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Verificou-se que o tratamento de nêspersas 'Fukuhara' com  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$  de metil salicilato, antes da refrigeração, foi capaz de reduzir significativamente a incidência de danos causados pelo frio nos frutos, o que possibilita estender o armazenamento refrigerado por até dois meses a  $1^\circ\text{C}$  (Figura 1). A imersão dos frutos em soluções com 1 ou  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido salicílico também mostrou ser capaz de reduzir o escurecimento interno dos frutos por até 45 dias a  $1^\circ\text{C}$ . No entanto, ao final do armazenamento, apenas os frutos tratados com metil salicilato apresentavam escurecimento interno dentro



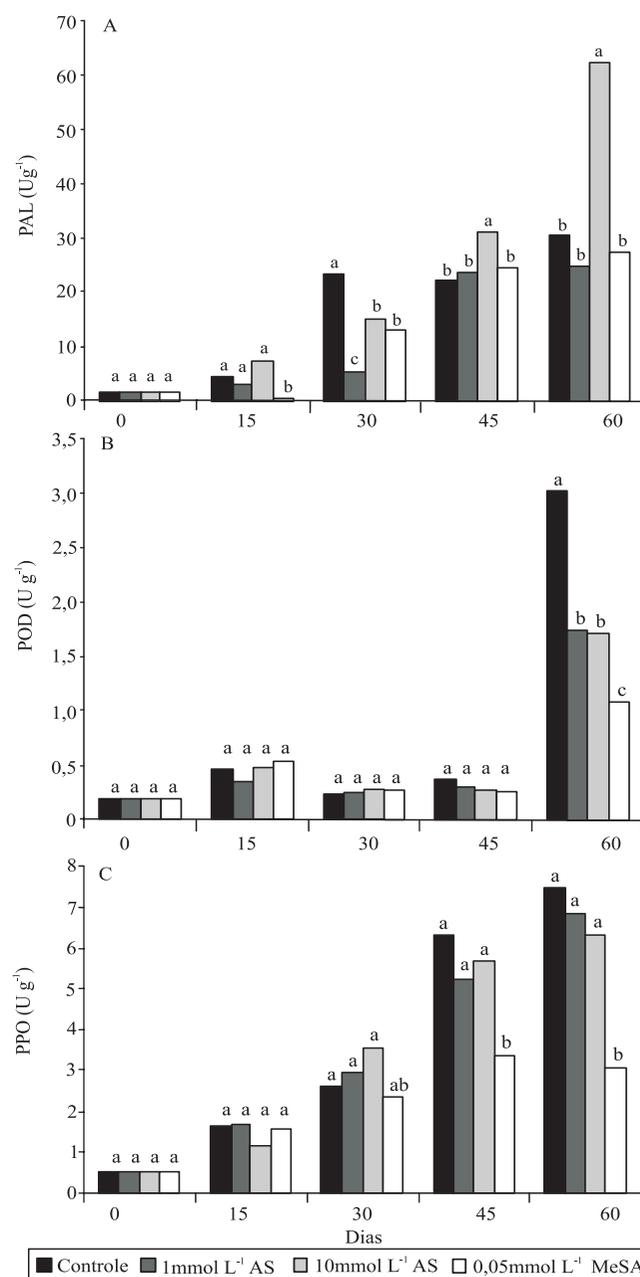
**Figura 1.** Índice de podridão (A) e de escurecimento interno (B), em nêspersas tratadas com ácido salicílico (AS) ou metil salicilato (MeSA), armazenadas a  $1^\circ\text{C}$  durante 60 dias. Médias seguidas de letras iguais, no mesmo período, não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

do limite aceitável para comercialização (índice <0,5). Apesar de os frutos tratados com 10 mmol L<sup>-1</sup> de ácido salicílico também exibirem índice de escurecimento interno inferior ao observado nos frutos controle aos 45 e 60 dias, essa concentração molar de ácido salicílico tornou os frutos mais suscetíveis às podridões. A redução da concentração da solução de imersão para 1 mmol L<sup>-1</sup> de ácido salicílico também mostrou não ser efetiva no controle de podridões e na redução do escurecimento interno da polpa, pois os índices relativos a esses parâmetros não diferiram significativamente dos observados aos 60 dias nos frutos não tratados (Figura 1). Uma das possíveis razões para a baixa efetividade do ácido salicílico pode ser a superficial ou insuficiente penetração do produto no tecido do fruto, quando aplicado por meio da imersão. Além disso, o fato de a solução de imersão ter removido a pilosidade natural da epiderme e favorecido o acúmulo de água na região apical dos frutos também pode ter contribuído para a maior ocorrência de podridões. Essa região do fruto foi o local onde, na maioria dos casos, também teve início o desenvolvimento fúngico.

Nos frutos tratados com 10 mmol L<sup>-1</sup> de ácido salicílico, o acréscimo da incidência de podridões, observado a partir dos 45 dias de armazenamento, coincidiu com uma abrupta elevação na atividade da fenilalanina amônia-liase, especificamente aos 60 dias de armazenamento. Nos demais tratamentos, entretanto, a atividade desta enzima não diferiu da observada no controle. Esse resultado mostra que a atividade da fenilalanina amônia-liase não foi influenciada pela aplicação de baixas concentrações de ácido salicílico ou metil salicilato. Além disso, altas concentrações de ácido salicílico ocasionam toxidez aos tecidos e tornam os frutos mais sensíveis a estresses bióticos. Por esta razão, pode-se inferir que a elevação na atividade da fenilalanina amônia-liase, durante o armazenamento refrigerado, não foi uma resposta associada à tolerância dos frutos ao frio, mas uma resposta de defesa contra a infecção fúngica.

A peroxidase está associada a reações de oxidação e acumulação de compostos fenólicos e, assim como a fenilalanina amônia-liase e a polifenoloxidase, também está envolvida em processos de indução de resistência em plantas (Mohammadi & Kazemi, 2002). Foi verificado que os índices de escurecimento interno e de frutos podres foram menores nos frutos tratados com 0,05 mmol L<sup>-1</sup> de metil salicilato e coincidiram com a menor atividade da peroxidase e polifenoloxidase ao final do armazenamento (Figuras 1 e 2). Considerando-

se que a elevação da atividade destas enzimas está diretamente associada à perda da compartimentação celular, acredita-se que a maior tolerância ao frio, observada nos frutos tratados com metil salicilato, pode



**Figura 2.** Atividade da fenilalanina amônia-liase – PAL (A), peroxidase – POD (B) e polifenoloxidase – PPO (C), em polpas de nêsperas tratadas com ácido salicílico (AS) ou metil salicilato (MeSA), armazenadas a 1°C durante 60 dias. Médias seguidas de letras iguais, no mesmo período, não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

ser decorrente de uma maior preservação da integridade celular desses frutos. A aplicação de 0,05 mmol L<sup>-1</sup> de metil salicilato aumenta a tolerância de nêspas ao frio, o que possibilita aumentar o armazenamento por até dois meses a 1°C.

### Referências

- CAI, C.; LI, X.; CHEN, K.S.; SHAN, L. Acetylsalicylic acid alleviates chilling injury of postharvest loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruit. **European Food Research and Technology**, v.223, p.533-539, 2006.
- DING, C.-K.; WANG, C.Y.; GROSS, K.C.; SMITH, D.L. Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate. **Plant Science**, v.161, p.1153-1159, 2001.
- EDAGI, F.K.; JOMORI, M.L.L.; KLUGE, R.A.; LIMA, G.P.P.; AZEVEDO, R.A.; SESTARI, I. Inibição da ação do etileno retarda o desenvolvimento de injúrias de frio em tangor 'Murcott'. **Ciência Rural**, v.40, p.1530-1536, 2010.
- EDAGI, F.K.; SESTARI, I.; SASAKI, F.F.; CABRAL, S.M.; MENEGUINI, J.; KLUGE, R.A. Aumento do potencial de armazenamento refrigerado de nêspas 'Fukuhara' com o uso de tratamento térmico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.1270-1276, 2009.
- KANG, G.; WANG, C.; SUN, G.; WANG, Z. Salicylic acid changes activities of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v.50, p.9-15, 2003.
- MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, v.162, p.491-498, 2002.
- SESTARI, I.; SASAKI, F.F.; JOMORI, M.L.L.; KLUGE, R.A. Improvement of cold tolerance in 'Tahiti' lime through heat treatments. **Acta Horticulturae**, n.877, p.953-958, 2010.
- WANG, L.J.; CHEN, S.J.; KONG, W.F.; LI, S.H.; ARCHBOLD, D.D. Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.41, p.244-251, 2006.

---

Recebido em 28 de fevereiro de 2011 e aprovado em 4 de abril de 2011