

MARIA CRISTINA CORSINI TOURINO

INJURIA MECANICA EM TECIDOS DOS FRUTOS DE DUAS
CULTIVARES DE PESSEGUEIROS (*Prunus persica* - (L) Batsch).
MECANISMOS DE CURA DO FERIMENTO

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura de Lavras, como parte
das exigências do curso de mestrado em
Ciência dos Alimentos, para obtenção do
grau de "Magister Scientiae".

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS - MINAS GERAIS

1990

MARIA CRISTINA CORSI TORINO

MECANISMOS DE CURA DO FERIMENTO
CULTIVARES DE PESSEQUEIROS (L.) Batsch
AUBRIA MECANICA EM TECIDOS DOS FRUTOS DE DUAS

Trabalho apresentado à Escola Superior
de Agricultura de Lavras, como parte
das exigências do curso de graduação em
Ciência dos Alimentos para obtenção do
grau de Bacharel em Ciências.

[REDACTED]

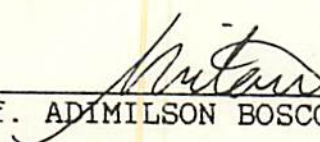
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS - MINAS GERAIS

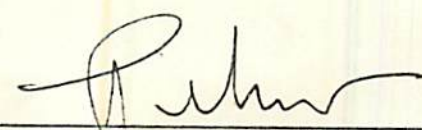
1990

INJURIA MECANICA EM TECIDOS DOS FRUTOS DE DUAS CULTIVARES
DE PESSEGUEIRO (*Prunus persica* - (L) Batsch):
MECANISMOS DE CURA DO FERIMENTO

APROVADA:


Prof. ADIMILSON BOSCO CHITARRA


Profa. MARIA ISABEL FERNANDES CHITARRA


Prof. JOSE DA CRUZ MACHADO

A Deus

agradeço as oportunidades a mim oferecidas
e a felicidade de sempre concluí-las
com Sua benção.

Dedico este trabalho a meus pais,
pelo amor e apoio,

A meus irmãos pelo incentivo e
carinho,

A meu sobrinho André, nossa maior
riqueza,

A minha querida, e sempre presente
tia "Tita" in memoriam.

AGRADECIMENTOS

A Escola Superior de Agricultura de Lavras através do Departamento de Ciências dos Alimentos - DCA, pela oportunidade da realização do Curso de Mestrado.

A FAEPE (Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão) e a FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) pelo auxílio financeiro e apoio técnico.

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

Ao Professor Admilson Bosco Chitarra pela dedicada orientação, pelo incentivo, confiança e sincera amizade demonstrados durante todo o período de realização deste trabalho.

A Professora Maria Isabel Fernandes Chitarra e Professores, Custódio Donizete dos Santos, Manoel Lousada Gavilanis e José da Cruz Machado, pelas sugestões, apoio e inestimável amizade.

Aos Professores Joel Augusto Muniz pela orientação nas análises estatísticas e ao Professor Prabir K. Chandra pelas sugestões.

A amiga e prima Cristiane Gattini Sbampato pela ajuda durante a montagem do experimento.

Aos funcionários da EPAMIG e Biblioteca Central pela delicadeza, atenção e apoio técnico.

Ao pessoal técnico lotado nos laboratórios do DCA, DFS, DQI, DS, DBI e Centro de Processamento de Dados pelo apoio técnico.

Aos colegas que juntos começaram essa longa caminhada, Lourdes Angela Marques, Soraia Borges Vilela, Ramon Gimenez e Acácio Couto Costa, e aos demais colegas pela agradável convivência e amizade demonstrados.

A todos que direta ou indiretamente tenham colaborado na realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

MARIA CRISTINA CORSINI TOURINO, nascida em Vitória ES, em 23 de abril de 1962, filha de Manoel Tourino Marafelli e Zilda Corsini Marafelli.

Graduou-se em Farmácia-Bioquímica pela Faculdade de Farmácia e Bioquímica do Estado do Espírito Santo, Vitória ES, em dezembro de 1985.

Experiência profissional em laboratório de análises clínicas (Microbiologia) e como professora estagiária na disciplina de Microbiologia no ano de 1985. Atualmente, professora substituta (Química Orgânica) no Departamento de Química da Escola Superior de Agricultura de Lavras, MG.

Iniciou o curso de mestrado em Ciência dos alimentos na Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL - MG, em janeiro de 1986.

SUMARIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISAO DE LITERATURA.....	04
2.1. Mecanismos de defesa contra injúrias em frutos e hortaliças.....	04
3. MATERIAL E METODOS.....	26
3.1. Procedência e pré-seleção dos frutos.....	26
3.2. Coleta e preparo das amostras.....	27
3.3. Análises físicas e físico-químicas dos frutos.....	28
3.4. Técnica de ferimento mecânico.....	29
3.5. Armazenamento dos frutos e obtenção dos discos.....	30
3.6. Análise química e enzimática nos discos de tecidos dos frutos.....	32
3.7. Análise estatística.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSAO.....	36
4.1. Atividade da peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PFO)...	36
4.2. Atividade da fenilalanina amônia-liase.....	41
4.3. Compostos Fenólicos.....	45

5. CONCLUSIONES.....	57
6. RESUMO.....	59
7. SUMMARY.....	61
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	63
APENDICE.....	79

LISTA DE TABELAS

Página

<p>TABELA 1 - Teores médios dos componentes físicos, químicos e físico-químicos das cultivares de pêssago, Biuti e Real, após a colheita.....</p>	29
<p>TABELA 2 - Atividade da POD ($\text{UA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ tecido) observada em tecidos de pêssagos 'Biuti' e 'Real' sem injúria (S) e injuriados mecanicamente (I), durante 48 horas de cura a 20°C e 75% UR.....</p>	38
<p>TABELA 3 - Atividade da PFO ($\text{UA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ tecido) observada em tecidos de pêssagos 'Biuti' e 'Real' sem injúria (S) e injuriados mecanicamente (I), durante 48 horas de cura a 20°C e 75% UR.....</p>	38
<p>TABELA 4 - Atividade da FAL ($\text{UA} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ tecido) observada em tecidos de pêssagos 'Biuti' e 'Real' sem injúria (S) e injuriados mecanicamente (I), durante 48 horas de cura a 20°C e 75% UR.....</p>	42

TABELA 5 - Teores de compostos fenólicos (mg de ácido tânico/100g de tecido) observada em tecidos de pêssegos 'Biuti' e 'Real' sem injúria (S) e injuriados mecanicamente (I), durante 48 horas de cura a 20°C e 75% UR..... 46

TABELA 6 - Reações de coloração da parede celular dos tecidos de pêssego 'Biuti' injuriados mecanicamente, após tempos de cura a 20°C e 75% UR..... 54

TABELA 7 - Reações de coloração da parede celular dos tecidos de pêssegos 'Real' injuriados mecanicamente, após tempos de cura a 20°C e 75% UR..... 55

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Via metabólica dos compostos fenilpropanóides.....	13
Figura 2 - Via biossintética da lignina em trigo. Rota provável e rota de menor significância.....	20
Figura 3 - Suporte com estilete, utilizado para injuriar mecanicamente os frutos.....	31
Figura 4 - Perfurador utilizado para retirar os discos de tecidos dos frutos.....	31
Figura 5 - Esquema de pêssego representando os tecidos e a profundidade da injuria.....	31
Figura 6 - Curvas de regressão entre atividade da POD e os tempos de cura em discos de tecidos de pêssego 'Real' e 'Biuti'. A) Com ferimento, 'Real' (.-.) e 'Biuti' (...); B) Sem ferimento, 'Real' (---) e 'Biuti' (___).	39

- Figura 7 - Curvas de regressão entre a atividade PFO e tempos de cura em discos de tecidos de pêssegos 'Real' e 'Biuti'. A) Com ferimento, 'Real' () e 'Biuti' (); B) Sem ferimento, 'Real' () e 'Biuti' ()..... 39
- Figura 8 - Curvas de regressão entre a atividade da FAL e tempos de cura nos discos de tecidos de pêssegos 'Real' (___) e 'Biuti' (---) injuriados mecanicamente..... 43
- Figura 9 - Curvas de regressão entre os compostos fenólicos totais e tempos de cura em discos de tecidos de pêssegos 'Real' (___) e 'Biuti' (---) injuriados mecanicamente expressas em mg ácido tânico/100g de tecido..... 47
- Figura 10 - Fotomicrografia da secção de tecidos do epicarpo e mesocarpo de pêssego pela coloração Nitroso teste: a) tecidos sem injúria; b) tecidos com injúria após 18 horas de cura indicando I Fenóis, II Acido tânico, III Catecol, IV Mistura de Fenólicos. Aumento de 400x 49
- Figura 11 - Fotomicrografia da secção de tecidos do epicarpo e mesocarpo de pêssego pela coloração Azul de O-toluidina: a) tecidos sem injúria; b) tecidos com injúria após 24 horas de cura, indicando I Substâncias fenólicas, II Paredes celulares não lignificadas, III Elementos lignificados. Aumento de 400x..... 51

Figura 12 - Fotomicrografia da secção de tecidos do epicarpo e mesocarpo de pêssago, pela coloração Safranina-Fast-Green: a) tecidos sem injúria; b) tecidos com injúria após 36 horas de cura, indicando: I Cutícula e elementos lignificados, II Mistura de fenólicos, III Paredes celulares não lignificadas. Aumento de 128x.. 52

LISTA DE ABREVIATURAS

- unidade relativa
- polivinilpirrolidone
- sólidos totais
- polifenolicidade
- peróxido
- fenolicidade
- sulfite

LISTA DE ABREVIATURAS

1. UR - umidade relativa
2. PVP - polivinilpirrolidona
3. SS - sólidos solúveis
4. PPO - polifenoloxidase
5. POD - peroxidase
6. FAL - fenilalanina amônia liase
7. cv. - cultivar

1. INTRODUÇÃO

O pessegueiro (*Prunus persica* (L) Batsch) é uma cultura de clima temperado que vem sendo bastante cultivada nas regiões sul e sudeste do Brasil, EMBRAPA (26).

O Brasil ocupa o 11^o lugar entre os países produtores do mundo e o 3^o da América do Sul, FAO (32).

O pêssego é um fruto consumido "in natura" ou destinado à indústria de suco e conservas. A qualidade dos frutos, para os fins a que se destinam, depende de suas características físicas e químicas, ALVARENGA & FORTES (02). Estas características podem ser alteradas por injúrias mecânicas, ocasionadas por intempéries (granizo) ou pela manipulação durante a colheita, transporte e armazenamento do produto.

A parede celular que circunda a célula vegetal, atua como barreira natural na proteção dos tecidos do vegetal contra injúrias mecânicas ou infecção, dificultando a entrada de microorganismos. No fruto, a epiderme desempenha um importante papel de proteção, pois as paredes celulares desse tecido são cobertas pela cutícula, que atua como barreira física e química. Entretanto, quando um fruto é injuriado mecanicamente, em

resposta a ferimentos e/ou ataque de patógenos, podem ocorrer modificações bioquímicas nestas paredes celulares envolvendo proteínas estruturais, enzimas ligadas à parede celular, compostos fenólicos, cutícula, lignificação e outros que podem bloquear a evolução do ferimento, BELL (06). A formação de uma epiderme adjacente ao local injuriado pode ocorrer como um dos mecanismos de defesa envolvidos numa sequência complexa de eventos, descrita como cura de ferimento, BLOCK (13).

Portanto, diferentes alterações podem ocorrer na parede celular do tecido vegetal após injúria mecânica e/ou infecção. Entretanto, a natureza precisa e a importância de muitas alterações nessas circunstâncias não estão bem esclarecidas.

Por outro lado as injúrias ocorridas em frutos e hortaliças podem levar à reações de escurecimento capazes de modificar a aparência, o sabor e o valor nutricional dos tecidos afetados além de conduzir, à deteriorização do produto, com prejuízos à sua comercialização.

Estudos sobre a cura de ferimentos mecânicos vêm sendo realizados em busca de soluções para se prevenir perdas pós-colheita.

Assim sendo, o presente trabalho tem como objetivo geral determinar se a injúria mecânica incita alterações bioquímicas e histoquímicas em tecidos do epicarpo e mesocarpo, envolvendo as paredes celulares, respectivamente em duas cultivares de pêssegos, caracterizando uma possível resposta de defesa a esse tipo de injúria. Como objetivo específico, verificar o mecanismo nos tecidos de pêssego através:

a) do comportamento das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase nos tecidos de pêssegos injuriados.

b) do estudo histoquímico, identificando as modificações ocorridas nas paredes celulares dos tecidos de pêssego após injúria.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mecanismos de defesa contra injúrias em frutos e hortaliças

Alguns vegetais apresentam uma resposta ao estímulo do ferimento, que pode ser feito artificialmente, ou à penetração de parasitas. Esta resposta pode ocorrer com reposição da camada de tecido prejudicado e/ou mudanças bioquímicas nos tecidos próximos à injúria, chamada cura do ferimento, BELL (06).

Os mecanismos de defesa desenvolvidos pelo vegetal contra injúrias vêm sendo analisados e avaliados através da ação de enzimas como peroxidases, polifenoloxidasas e fenilalanina amônia-liase, síntese de compostos e modificações ocorridas nas paredes celulares dos tecidos injuriados.

Enzimas

A Peroxidase (POD) é uma hemoproteína, que ocorre naturalmente em vegetais. Cataliza a reação oxidativa entre peróxidos e certos compostos fenólicos como monofenóis, difenóis

e aminas aromáticas, entre outros. Geralmente é intracelular, podendo, também, estar associada à parede celular por ligações iônicas ou covalentes, Ridge citado por WHITMORE (90) e SCOTT (89).

A POD possui isoenzimas cujas presença e atividade variam com a fase de desenvolvimento do vegetal, com o tipo de tecido e em respostas à injúrias, como foi verificado por (10, 30, 64, 88, 90).

Enzimas como a POD podem agir como catalizadores do escurecimento enzimático em frutos e hortaliças. Dessa forma, algumas alterações indesejáveis como mudança de cor e sabor podem ocorrer durante a manipulação, o armazenamento e o processamento do produto, Haard citado por PRABHA & PATWARDHAN (64) e PECH & FALLOT (63). Portanto, esta enzima estando intimamente ligada aos aspectos do escurecimento enzimático, está diretamente relacionada à qualidade do fruto ou da hortaliça. Em relação às condições de armazenamento, a POD resiste à baixas temperaturas (-18°C) e UR (12,5%), apresentando também grande resistência à inativação térmica, sendo considerada a enzima mais termoestável dos vegetais e usada como índice de branqueamento, BURNETTE (18).

Os pesquisadores das áreas de fisiologia pós-colheita e tecnologia de transformação procuram meios de inibir ou prevenir o escurecimento de tecidos vegetais. Assim, várias pesquisas vêm sendo realizadas em pêssegos, durante o seu desenvolvimento e amadurecimento, para caracterização da enzima POD quanto ao seu pH (4 a 5) e temperatura ótima, concentração de substrato (guaiacol), isoenzimas, inibidores (dietil tiocarbamato de sódio, floroglucinol) e antioxidante, REYES & LUH (69); FLURKEY

& JEN (30). Outras pesquisas vêm sendo conduzidas em tecido de batata e couve, MIHALYI et alii (54); casca e polpa de maçã, sapoti e manga entre outros, PRABHA & PATWARDHAN (64).

Entretanto, a função da POD na fisiologia da parede celular e sua participação em mecanismo de defesa no vegetal ainda não estão bem esclarecidos. ?

Após injúria mecânica ou infecção, o vegetal desenvolve mecanismos de defesa nos quais pode haver participação da POD ligada à parede celular. A injúria induz um aumento nas frações das isoenzimas, principalmente na fração covalentemente ligada à parede, como foi observado em folhas de milho por BIRECKA et alii (10). Em pinheiros da Flórida, foi observada a formação destas ligações em células cambiais e do calo, sendo que as ligações foram catalizadas principalmente pela POD ligada à parede celular. O envolvimento da enzima neste mecanismo foi verificado "in vitro" por GOLDBERG et alii (38).

Além disso, foi observado aumento na atividade da POD em vários tecidos como resposta à infecção por *Cercospora* em beterraba, RAUTELA & PAYNE (66); à podridão negra causada por *Ceratocystis fimbriata* em batata doce, CLARE, WEBER & STAHMANN (21); a *Helminthosporium avenae*, em folhas de *Phalaris arundinacea* L., VANCE et alii (88); à injúria por corte, em folhas de milho, BIRECKA et alii (10) e em folhas e medula do tabaco, BIRECKA, CATALFAMO & URBAN (11), BIRECKA & MILLER (12).

Os estudos histoquímicos, para verificar as modificações ocorridas no sítio de penetração do microorganismo ou local da injúria, revelam a atividade da POD em células próximas a este

sítio, VANCE et alii (88). Os autores sugerem que as isoperoxidasas estejam envolvidas nos mecanismos de defesa dos tecidos e possam funcionar na biossíntese da lignina, no local da injúria.

Além dessa via, a POD poderia proteger o tecido injuriado através da oxidação de compostos fenólicos, formando produtos tóxicos que afetam o patógeno e as células infectadas, levando-os à morte e necrose do tecido, ROMA e DEUNLAY, citados por BIRECKA, CATALFAMO & GARRAY (10).

A formação de pigmento escuro nas áreas injuriadas é um fenômeno relacionado com a oxidação de compostos fenólicos onde outra enzima, a polifenoloxidase (PFO), atua como catalizadora na presença de oxigênio, LUH & PHITHAKPOL (52).

A PFO também conhecida como fenolase, tirosinase e catecoloxidase, pertence ao grupo das oxidases e contém cobre como grupo prostético, MAYES (53). O mecanismo de ação da PFO ainda é obscuro. Sabe-se que ela oxida dopacromos que se polimerizam e formam as melaninas, pigmentos escuros e tóxicos à microorganismos e células, GALEAZZI (35) e VAMOS-VIGYAZO et alii (86). Ela pode ser encontrada em tecidos vegetal e animal. Já foi identificada em alguns frutos como maçã e abacate, PRABHA & PATWARDHAN (64), pêssego, FLURKEY & JEN (30), cereja, BENJAMIN & MONTGOMERY (07) e banana, PALMER (59).

A sua distribuição pode ser desuniforme no fruto, podendo ocorrer maior atividade nos tecidos do pericarpo e em outros tecidos como foi verificado em maçã por SATAQUE & WOSIACKI (77). Tal atividade diminui nos estádios de desenvolvimento do fruto como foi observado durante a maturação, em maçã COSETENG &

LEE (22) e em Pêssego, e FLURKEY & JEN (30).

PRABHA & PARTWARDHAN (64) verificaram, também, diminuição da atividade da PFO na epiderme da maçã e sapoti, polpa e epicarpo de abacate.

A PFO pode ser encontrada na forma solúvel e insolúvel. Numa ampla variedade de plantas, esta enzima já foi localizada nos cloroplastos e na lamela de tecidos de vegetais como o espinafre, Tolbert citado por GALEAZZI (35). Em pêssegos a PFO ligada à parede celular das células do mesocarpo, foi estudada por SCHALLER & VAMOS-VIGYAZO (79), guiados pelo interesse tecnológico de verificar a sua termoestabilidade. Concluíram que ela é termolábil e pode ser inativada pelo calor.

Em geral, as pesquisas sobre PFO objetivam à sua caracterização quanto a especificidade por substrato (catecol, ácido clorogênico, ácido cafeico), à atividade em relação a condições ótimas de pH (5 a 7), temperatura (em relação a sua termoestabilidade); tipos de cultivares e de tecidos que apresentam maior atividade; inibidores (dietil ditiocarbamato de sódio, dióxido de enxofre, floroglucinol) e isoenzimas. Tais características foram estudadas em pêssegos (52, 61, 78, 80, 85, 87, 92).

Os estudos sobre as características da PFO vêm sendo realizados em vários frutos e hortaliças. A partir destes e de outros conhecimentos básicos, os pesquisadores têm procurado desenvolver métodos para prevenir o escurecimento enzimático no qual a PFO participa e que muitas vezes, é indesejável nestes produtos.

Existem alguns métodos de prevenção que vão desde os mais tradicionais como a inativação térmica, por exemplo, até aqueles que utilizam a aplicação de hormônios como o etefon e o ácido giberélico. Uma diminuição da atividade da PFO e redução do escurecimento enzimático pós-colheita foram observados em pêssegos tratados com o etefon e ácido giberélico, por PAULSON et alii (61) e em pêssegos e maçãs tratados com etefon, por AKHUNDOV, KULIEV & SALKOVA (61). Os dois tratamentos foram feitos alguns dias antes da colheita, verificando-se nos frutos maduros, uma diminuição na atividade da PFO. Estes últimos autores concluíram que a diminuição na atividade da enzima poderia ser devido à formação de um inibidor enzimático ou à modificação do complexo enzima-substrato. Contudo, a PFO além de participar do escurecimento enzimático (principalmente em frutos) juntamente com a POD, pode desempenhar um importante papel nos mecanismos bioquímicos de resistência à injúrias.

Segundo BELL (66), nas paredes das células ao redor de protoplastos colapsados ocorre formação de pigmentos escuros (melaninas), o que normalmente caracteriza a necrose associada à resistência à raças específicas de microorganismos. A intensidade de formação das melaninas é maior nos vegetais altamente resistentes, sugerindo que as melaninas ou seus precursores contribuem para essa resistência. A localização e flutuação na atividade das enzimas POD e PFO foram relacionadas aos mecanismos de resistência desenvolvidos pelas folhas de quatro variedades de beterraba (*Beta vulgaris* (L.)) em resposta à infecção por *Cercospora*, por RAUTELA & PAYNE (66). A atividade da PFO foi determinada principalmente nos cloroplastos e mitocôndrias,

enquanto que, a POD foi localizada, principalmente, na fração solúvel das folhas de beterraba. Os autores verificaram um aumento imediato desta enzima como uma resposta à infecção, sendo mais pronunciado nas variedades de beterraba resistentes ao microorganismo.

O aumento na atividade de oxidases como a POD e PFO, na parede celular, parece preceder a necrose. Entretanto, pouca atenção tem sido dada à possível interrelação entre estas enzimas e os mecanismos de resistência do vegetal.

Os estímulos causados pela injúria mecânica também afetam o metabolismo fenilpropanóide do tecido vegetal. A ativação desta via metabólica em vegetais doentes tem sido associada aos mecanismos de resistência do hospedeiro contra o patógeno. Normalmente, este metabolismo conduz a formação de ácido cinâmico, que é precursor de inúmeros compostos encontrados naturalmente no tecido vegetal como lignina e flavonóides. O ácido cinâmico é derivado biossinteticamente da fenilalanina. A sequência das reações enzimáticas é apresentada na Figura 1, LEGRAND (51).

A fenilalanina amônia-liase (FAL) atua no metabolismo secundário dos vegetais catalizando a conversão de L-fenilalanina a ácido cinâmico e amônia, Koukol e Conn citados por MINAMIKAWA & URITANI (55). A partir do aminoácido fenilalanina são sintetizados todos os compostos fenilpropanóides, RHODES (73).

Na natureza, a FAL tem sido encontrada em muitos vegetais como em feijão, RAHE, KUC & CHUANG (65), em milho, DICKERSON et alii (25); HAVIR, REID & MARSH (40); em laranja, ISMAIL & BROWN (45); bambu, HIGUCHI (41) e na casca de maçã,

FARAGHER & CHALMERS (28).

Estudos histoquímicos localizaram a FAL nas células epidérmicas das bagas de *Vitis vinifera*, L., ROUBELAKIS-ANGELAKIS & KLIEWER (74). JAHNEN & HAHLBROCK (46), utilizando anticorpos enzimas-específicos, localizaram a enzima "in situ" na plântula de salsa. Segundo esses autores, a enzima foi encontrada predominantemente nas células que envolvem o ducto condutor de óleo.

A FAL não requer cofatores para sua atividade e algumas isoenzimas têm sido identificadas em tecidos vegetais, CAMM & TOWERS (19). No que se refere a inibidores, foi verificado que a cicloheximida além de inibir a atividade da FAL, também pode inibir, de forma irreversível, a sua síntese, ZUCKER (94).

Os níveis da FAL aumentam significativamente em determinados tecidos, a intervalos de tempo relativamente pequenos, como resposta a uma ampla variedade de estímulos como etileno, HYODO & YANG (42); FARAGHER & CHALMERS (28); injúrias mecânicas, TANAKA & URITANI (81), WONG, ZUCKER & CREASY (93) e infecções GREEN, HADWIGER & GRAHAM (39), MINAMIKAWA & URITANI (55), e após esse aumento, ocorre um declínio gradual. Tal redução poderia sugerir uma predominância do processo sintético sobre o degradativo, o que é característico do "turnover" da proteína vegetal, segundo ZUCKER (95). Contudo, para ENGELSMA (27), esse declínio nos níveis da FAL, que se sucede ao aumento inicial, é provavelmente causado pela inativação da enzima. Esta inativação seria dependente da ocorrência da "síntese de novo" da proteína, visto que, a

cicloheximida, o inibidor da síntese protéica, inibe a atividade da FAL.

As variações na atividade da FAL, na fase de pós colheita dos frutos, podem ser parcialmente devidas à "síntese de novo" desta enzima, embora não se possa generalizar. Tal síntese foi demonstrada através da taxa de incorporação de leucina [C^{14}] na FAL, em tecido parenquimatoso da raiz de batata doce, injuriada mecanicamente, TANAKA & URITANI (81), e em raízes de bambu que foram colhidos, cortados e armazenados por um dia, em temperatura entre 28° e $30^{\circ}C$, utilizando-se para a determinação, a técnica de imunoelctroforese, CHEN, CHANG & LIU (20). Contudo, estes últimos autores sugerem que o aumento na atividade da enzima pode ser devido a uma simples ativação da mesma. Assim, a FAL parece ser muito sensível ao estado fisiológico do vegetal, podendo sua atividade ser alterada quando o tecido é injuriado.

A participação da FAL no metabolismo de difenilpropanóides tais como antocianinas e lignina, vem se tornando de grande interesse para a fisiologia pós colheita de frutos e hortaliças. Isto porque, além destes compostos contribuírem para as características sensoriais do produto, eles também parecem participar de algumas respostas nos mecanismos de defesa do vegetal. A possível participação na sequência complexa de eventos, ocorridos como respostas metabólicas à injúria, vem sendo avaliada.

A FAL parece oferecer o esqueleto carbônico fenilpropano para a síntese de compostos fenólicos, pois o aumento em sua atividade foi observado paralelamente ao acúmulo

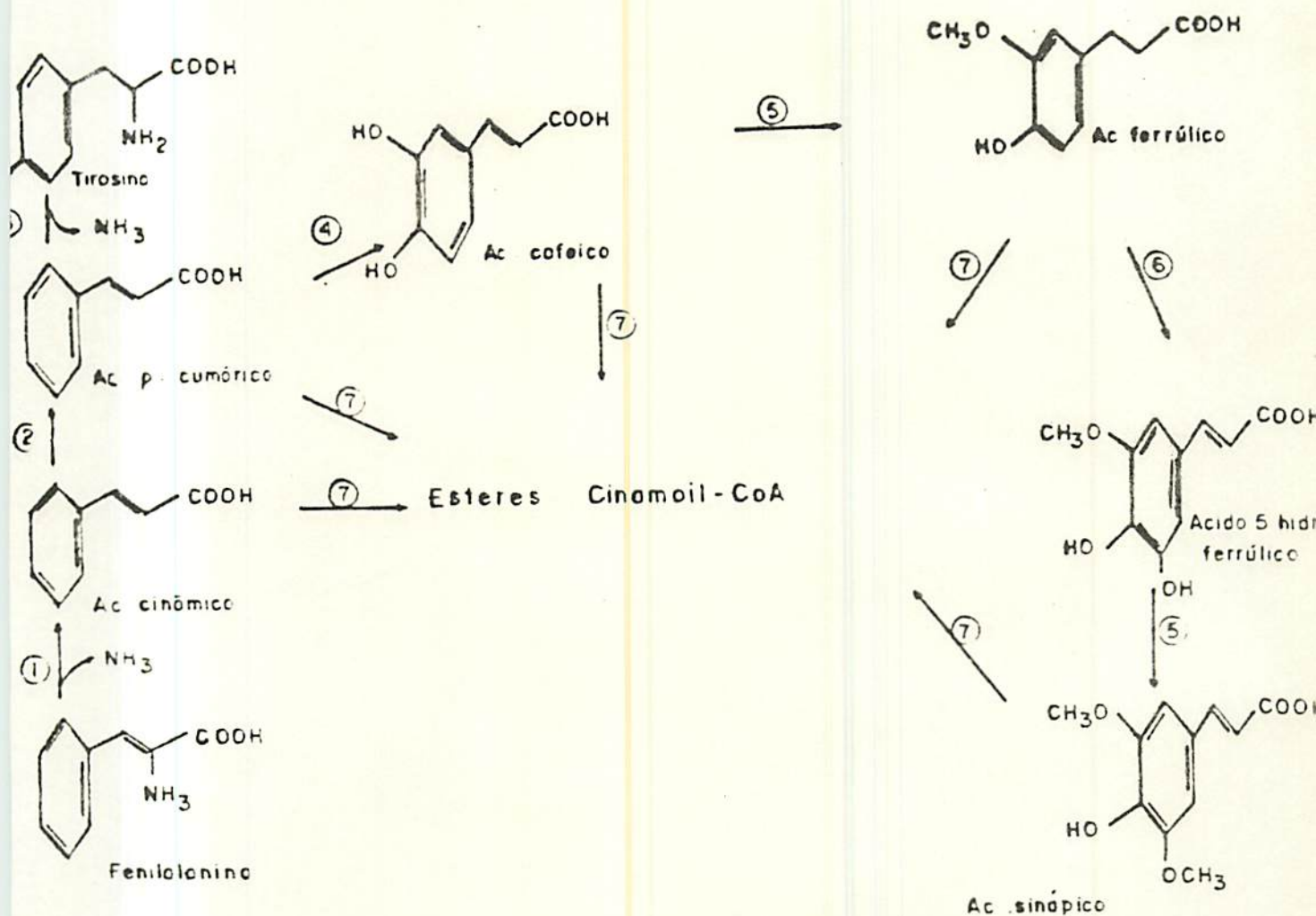


Figura 1 - Via metabólica dos compostos fenilpropanóides. 1, Fenilalanina amônia-liase; 2, ácido trans-cinâmico 4 - Monooxigenase; 3, Tirosina amônia-liase; 4, Acido p-cumárico 3-monooxigenase; 5, O-difenol-O-metil transferases; 6, Acido ferrúlico 5-hidroxilase (hipotética); 7, Acido cinâmico - CoA ligase. LEGRAND, M (54).

destes compostos em discos (3 x 19mm) retirados da raiz de batata doce "Norin", MINAMIKAWA & URITANI (55), e na epiderme de tomates "Moneymaker", GLAZENER (36), após injúria mecânica e infecção destes tecidos.

Os estudos sobre os compostos fenólicos têm sido realizados avaliando a sua participação em reações de escurecimento, bem como, sua associação à resistência dos vegetais à injúrias.

Compostos fenólicos

Os fenólicos vegetais incluem uma ampla variedade de compostos, desde simples fenóis, ácidos fenólicos, cumarinas, até flavanóides e lignina, dos quais a maior parte é derivada do ácido benzóico ($C_6 - C_1$) e ácido cinâmico ($C_6 - C_3$). O primeiro é metabolizado do ácido shiquímico, ou provém da remoção do acetato do ácido cinâmico, e o segundo, é derivado da desaminação da L-fenilalanina, Gross citado por TORRES et alii (83).

Em geral, os fenólicos são encontrados em folhas, frutos e sementes TORRES et alii (83), AMPOMAH & FRIEND (83) e MOSED & HERRMANN (56). Sua quantidade varia entre as cultivares, em seus diferentes órgãos e no interior dos próprios órgãos do vegetal, TORRES et alii (83). Durante o desenvolvimento, os teores variam, podendo estabilizar na maturidade, como ocorre em pêra e maçã, segundo MOSED & HERRMANN (56).

Sob outro aspecto, tal como em infecções, a concentração pode variar, com acúmulo de fenólicos que podem ser

tóxicos aos patógenos. A importância deste acúmulo no tecido injuriado tem sido objeto de muitas pesquisas.

AMPOMAH & FRIEND (63), estudaram duas cultivares de batata; uma resistente e outra susceptível a *Phytophthora infestans*. Os autores observaram acúmulo de fenólicos na parede das células, sendo considerado mais importante do que o acúmulo de fitoalexinas nos discos de tubérculos de batata resistentes à raças não específicas de *Phytophthora infestans*. Os fenólicos insolúveis parecem conter ácido clorogênico, ácido para-cumárico esterificado, ácido ferrúlico, lignina e/ou suberina.

Em injúria causada por microorganismos, o tecido pode apresentar como resposta de defesa, a formação de lesões necróticas locais, que isolam e localizam o processo.

A atividade da FAL foi fortemente induzida neste tipo de reação de hipersensibilidade ocorrida na folha de tabaco infectada por vírus do Mosaico, segundo observado por KOPP, GEOFFROY & FRITIG (50) e tomate inoculado com *Botrytis cinerea*, GLAZENER (36). Todavia, nenhuma variação significativa na atividade da FAL, foi verificada em extratos de mesocotilos de milho, de cultivares resistentes e susceptíveis a *Helminthosporium maydis* e resistentes a *H. carbonum*, quando estes mesocotilos foram inoculados com esses microorganismos, conforme DICKERSON et alii (25).

Em discos (3 x 19mm) de tecidos da raiz de batata, após a injúria mecânica, também foi observado acúmulo de fenólicos paralelamente ao aumento da atividade da FAL, MINAMIKAWA & URITANI (55), e em paredes celulares de citrus, após exposição a irradiação gama, RIOV, MONSELISE & KAHAN (72).

A cura de injúria em citrus, parece ser um processo biológico ativo que envolve a indução da FAL e possivelmente outras enzimas, ISMAIL & BROWN (45). Os autores observaram que no flavedo de laranja 'Valência' ocorreu a indução da FAL e o subsequente acúmulo de fenólicos como resultados da cura ativa, que se segue à injúria mecânica.

Em relação as antocianinas, a interrelação entre atividade da FAL e síntese destes compostos foi investigada na casca de maçã. A síntese da FAL foi estimulada pela luz, sendo observado um aumento em sua atividade e acúmulo de antocianinas no tecido. Mas os resultados indicaram que, embora os níveis da FAL possam controlar a taxa de síntese de antocianinas no fruto total, ela não seria o único regulador crítico da síntese destes compostos na casca da maçã, como relatam PASCHOLATI et alii (60). Além disso, em algumas espécies de *Mirtilo* e em *Oxycoccus palustris*, o acúmulo de antocianinas, na epiderme destes frutos, não foi relacionado com o aumento na atividade da FAL, SAPERS, MATULAITIS & BECK (76).

Quanto à lignina, foi observado que a síntese progressiva da FAL, juntamente com, tirosina amônia liase (TAL) ocorreu exatamente antes da lignificação das raízes e caule de bambu, colhidos e cortados em várias porções. As enzimas FAL e TAL desaminaram a L-fenilalanina e L-tirosina, respectivamente, produzindo o ácido cinâmico, precursor de uma variedade de constituintes, inclusive lignina, HIGUCHI (41).

Um aumento na atividade da FAL e nos níveis de ácido clorogénico, acompanhado por um acúmulo de um polímero tipo-lignina, foi observado em tubérculos de batata inoculados com

fungo, *Phytophthora infestans*, FRIEND, REYNOLDS & AVEYARD (33). Em tomates, a atividade da FAL também aumentou após a inoculação de *Botrytis cinerea*, e os resultados indicaram síntese de produtos tipo-lignina pelos frutos jovens, após infecção pelo fungo, e lignificação das paredes celulares na epiderme de tomate, GLAZENER (36).

O aumento na atividade da FAL, em geral, precede o acúmulo de lignina em tecidos com infecção e este fato pode ser correlacionado com a resistência do vegetal a determinada doença, BELL (06).

O tempo para que a FAL apresente sua atividade máxima varia de acordo com o tecido e o tipo de injúria. Em injúria mecânica, foi verificado atividade máxima após 12 horas, na polpa da raiz de batata, ZUCKER (95), e na raiz de batata doce, TANAKA & URITANI (81). No flavedo de laranja a atividade máxima foi observada 24 horas após injúria, ISMAIL & BROWN (45). Nas infecções, a atividade da enzima tem apresentado elevação logo após 4 a 6 horas de inoculação, ocorrendo máxima atividade em 24 a 36 horas, respectivamente, em batata infectada por *Ceratocystis fimbriata*, MINAMIKAWA & URITANI (55), e em trigo inoculado com *Erysiphe graminis*, GREEN, HADWIGER & GRAHAM (10).

Portanto, a indução do metabolismo fenilpropanóide que se segue após os estímulos, como injúria mecânica, oferece interessante campo para estudos sobre a regulação do metabolismo secundário do vegetal e sua relação com mecanismos de defesa. Neste estudo, um pré requisito importante para avaliação da regulação metabólica é a caracterização das enzimas envolvidas neste processo.

Parede celular

A parede celular é uma estrutura bastante resistente que envolve o plasmalema das células vegetais. Biologicamente, esta estrutura é importante porque determina a morfologia e de alguma forma, a função da célula. Além disso, ela também é o envoltório limitante da célula, podendo estar diretamente envolvida na regulação da expansão celular. Quimicamente, é constituída por polissacarídeos, lignina, proteínas, água e substâncias incrustantes como cutina e suberina, GOODWIN & MERCER (37).

Os polissacarídeos da parede celular podem atuar como barreira natural à injúrias, sendo que a proteção pode ser aumentada pela presença de matérias como cutina, suberina, lignina ou outros. Dessa forma, torna-se pouco frequente a penetração de microorganismos nas células vegetais, provavelmente devido a incapacidade de penetrarem nas paredes celulares. Estas paredes não são estáticas e podem, em muitos casos, ser dinamicamente alteradas. As alterações podem envolver modificações na parede já existente, deposição de novos materiais (tipo lignina), ou produção de nova barreira através de divisão celular, RIDE (70).

A lignina é um polímero, muito ramificado, de resíduos fenilpropano ($C_6 - C_3$), de importância nos tecidos condutores e de sustentação, sendo constituintes das paredes celulares destes tecidos, estando também presente nas paredes celulares de raízes, casca, cortiça, botão floral e frutos. Ela fortalece a *parede celular* e protege as microfibras da parede contra ataques

químicos, físicos e biológicos, GOODWIN & MERCER (37). A formação deste polímero pode ocorrer a partir da condensação de radicais álcoois hidroxicinamil, derivados da fenilalanina, de resíduos de ácidos hidroxicinâmicos ou aldeídos hidroxicinamil, BELL (06).

A Figura 2 mostra a rota biossintética da lignina em trigo, descrita por RIDE (71).

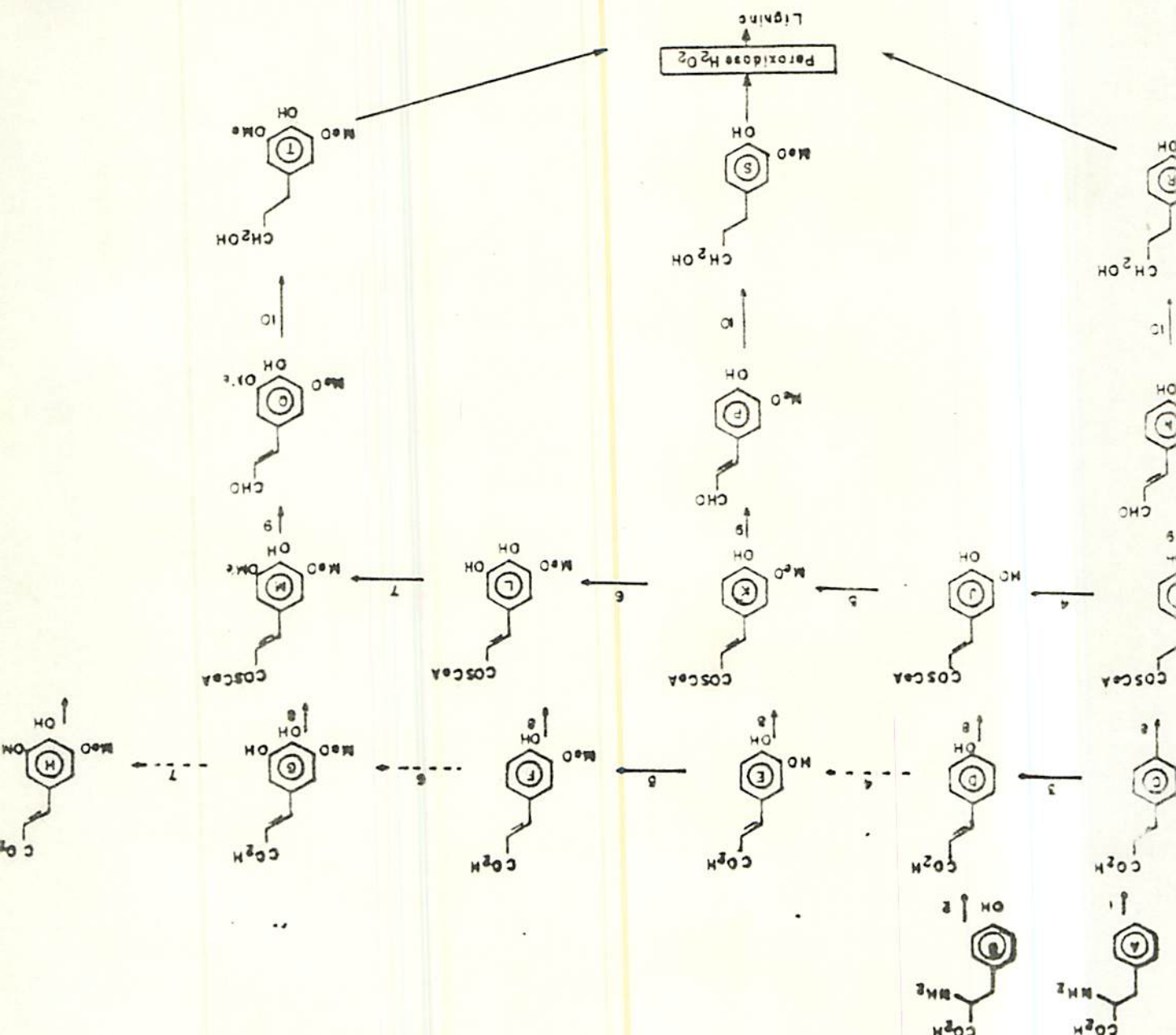
A lignina é depositada na matriz da parede celular entre a microfibrila de celulose e sua rede de complexos aromáticos, provendo uma rigidez e resistência à forças de compressão, bem como uma considerável resistência à degradação por microorganismos, RIDE (71). Ela pode formar ligações fortes com carboidratos da parede celular, como celulose, através da ação da POD, WHITMORE (90). Além disso, podem ocorrer ligações éster da lignina com poliésteres de ácidos graxos, similares àqueles na cutina, para formação de suberina, KOLATTUKUDY (49). As células suberizadas não são atacadas por microorganismos, BELL (06).

A ocorrência, velocidade e extensão da lignificação têm sido relatadas em mecanismos de defesa desenvolvidos pelo vegetal frente à uma injúria, BOSTOCK & STERMER (17).

Por suas propriedades, a lignina parece ter um papel potencial na resistência do vegetal à patógenos. A associação entre a lignina pré-formada e a limitação do crescimento de microorganismo em tecido vegetal tem sido observada em algumas doenças.

Quando o tecido é ferido, pode ocorrer lignificação da parede celular das células ao redor do ferimento ou sítio de

Figura 2 - Via biossintética da lignina em trigo. Rota provável (---), rota de menor significância (---). Intermédios: A, fenilalanina; B, tirosina; C - H, ac. trans-câmico, p-cumárico, caféico, ferúlico, 5-hidroxi ferúlico e sináptico; I-M, ésteres CoA dos ac. D,H; N, p-cumaraaldeído; P, conterialaldeído; Q, sináplaldeído; R, álcool p-cumárico; S, álcool conterial; T, álcool sinápl. Enzimas: 1, fenilalanina amônia-liase; 2, tirosina amônia-liase; 3, cânmato; 4 hidroxiase; 4,p - cumarato 3 hidroxiase; 5, cafeate Ometiltransferase; 6, ferúlicato 5 hidroxiase (hipotética); 7,5-hidroxi ferúlicato O metiltransferase; 8, hidroxi amato; 9, cânmato; 10 CoA redutase; 10 cânmatil álcool desidrogenase. RIDE (71).



penetração do parasita, como foi verificado em folhas de trigo inoculadas com fungo, RIDE (71); em laranja e uva feridas mecanicamente e inoculadas com *Penicillium digitatum*, BROWN et alii (15); em laranja inoculada com o mesmo fungo, BROWN & BARMORE (14); e na casca do caule de pessegueiro injuriado mecanicamente, na qual foi observado também a suberização das paredes celulares vizinhas ao ferimento, BIGGS & STOBBS (09) e BIGGS (08). Estes últimos autores observaram que a injúria levou à geração de um novo tecido com o restabelecimento da continuidade meristemática. BIGGS (08) identificou após o ferimento dois tipos de tecidos, a saber: tecido com paredes celulares modificadas (por lignificação ou suberização) e geração de um novo felogênio e seus derivados. RIDE (71) estudando folhas de trigo injuriadas mecanicamente e depois inoculadas com fungos patogênicos e não patogênicos, relata que apenas o ferimento mecânico não estimula a lignificação. A síntese da lignina ocorre após a inoculação com fungos e o polímero formado apresenta estrutura diferente do polímero das folhas. Além disso, o autor relata que uma pré-inoculação com o fungo não patogênico retarda o ataque pelo fungo patogênico.

Assim, a lignificação que ocorre nas paredes celulares ao redor do ferimento em tecido de folhas e frutos, parece ser induzida não só pela injúria em si, como também, e principalmente pelos microorganismos. Este mecanismo difere marcadamente do acúmulo de fitoalexinas, que é o outro mecanismo de resistência induzido por doenças. As fitoalexinas podem ser induzidas por elicitores abióticos como foi verificado em folhas de trigo tratadas com substâncias elicitoras de fitoalexinas, sendo que,

não foi observado acúmulo de lignina no mesmo tecido, PEARCE & RIDE (62).

Em outro estudo, PEARCE & RIDE (69), verificaram que um componente da parede celular de muitos fungos, a quitina, elicitou a lignificação quando foi aplicada sob forma de suspensão em injúrias, nas folhas de trigo.

Contudo, UCHIYAMA, et alii (84), não observaram lignificação em callus de arroz como resposta aos fungos, *Alternaria brassicola*, *Botrytis cinerea* e *Aspergillus oryzae*, apesar de identificarem o ácido ferrúlico no callus de arroz inoculado com a *A. brassicola*, o que não afetou a germinação de esporos nem o crescimento micelial do fungo. A síntese e o acúmulo de lignina podem variar com as condições de armazenamento. Em uvas e laranjas inoculadas com fungo, foi observado que os frutos armazenados sob temperatura próxima a 30°C apresentaram lignificação ao redor do ferimento, entretanto sob uma UR menor que 70% a lignificação foi mínima, BROWN et alii (15).

Tem sido sugerido que os polissacarídeos pécticos (ou os oligossacarídeos derivados deles) possam ser liberados da parede celular, após o ferimento de folhas, e agir como hormônios de longa distância, estimulando uma resposta de defesa no tecido não injuriado e vizinho ao ferimento, Bishop et alii citados por BAYDOUN & FRY (05). A partir daí, os autores infiltraram fragmentos pécticos radioativos em ferimentos localizados em folhas de tomate e concluíram que as substâncias pécticas não são hormônios de longa distância. Existe porém, segundo os autores, a possibilidade de que estas substâncias

atuem nas vizinhanças do ferimento e estimulem um segundo mensageiro que poderia ser um hormônio.

Além da lignina, as paredes celulares, de células epidérmicas que são expostas à atmosfera, são cobertas pela cutícula. A cutícula é hidrofóbica e regula a perda ou ganho excessivo de água pelo tecido, GOODWIN & MERCER (37). Ela também atua como barreira mecânica e química contra a germinação e penetração dos fungos nas folhas e em outros tecidos vegetais BELL (06). O principal polímero da cutícula é a cutina. Na epiderme das partes subterrâneas do vegetal, como raízes e tubérculos, e na periderme formada sobre algum órgão do vegetal, após o ferimento, a cutina é substituída por outro polímero, a suberina, KOLATTUKUDY (49). O primeiro polímero consiste de uma complexa mistura de hidroxí-ácidos graxos unidos por ligações éster, formando uma rede tridimensional, e o segundo, é formado por ácidos dicarboxílicos saturados e não saturados de cadeias longas de dióis, GOODWIN & MERCER (37).

A biossíntese da cutina e da suberina tem sido também objeto de estudos. Algumas fases das vias têm sido demonstradas utilizando-se métodos bioquímicos modernos com o uso de precursores e intermediários sintéticos marcados. Para a cutina são sugeridas vias biossintéticas à partir de monômeros da família dos ácidos graxos C_{16} e C_{18} , citando como exemplo o palmítico e linoléico, respectivamente. A síntese da cutina é uma função especializada das células epidérmicas. Os fatores de desenvolvimento e ambientais podem levar à modificações neste polímero. Quanto à suberina, o seu maior componente é o ω -ácido hidroxiloléico, sendo que, a única reação envolvida na biossíntese

deste composto é a conversão do w-hidróxi ácido graxo a ácido dicarboxílico, KOLATTUKUDY (49).

A suberina pode ser sintetizada em resposta à injúrias. As injúrias por corte provocaram uma suberização nas camadas próximas ao ferimento em raiz de batata, BORCHET (16), e em bulbos de alhos, MOON & PETERSON (57). Algumas vezes pode ocorrer suberização nas paredes das células vizinhas ao ferimento, embora o polímero protetor natural do tecido seja a cutina, como ocorreu em tomates, feijão de vagem e folhas de *Brassula argentea* feridas mecanicamente, DEAN & KOLATTUKUDY (24).

As células mais externas da periderme parecem responder às injúrias mais rapidamente do que as dos tecidos mais profundos.

WILSON & GRANGE (91), trabalhando com tomateiro e pimenteira doce, feridos com cortes longitudinais nos internodos jovens, observaram 3 fases de regeneração: fase sem divisão nem alongamento celular, chamada fase lag, fase de divisão e fase de diferenciação. As células, próximas à superfície, proliferaram para formar o calo, dentro do qual os tecidos vasculares diferenciaram-se e tenderam a restaurar o cilindro vascular, em cada parte.

Uma injúria na epiderme pode ser a porta de entrada para o início de uma infecção. A habilidade dos vegetais de formarem camadas para bloquear o ferimento é importante no transporte, manuseio e armazenamento dos produtos agrícolas.

Diferentes alterações nas paredes celulares podem ocorrer após a injúria ou infecção como acúmulo de substâncias

fenólicas, CRAFT & AUDIA (23). Entretanto, a natureza precisa e importância de muitas alterações não estão bem esclarecidas, havendo necessidade de maiores estudos sobre o papel da parede celular na defesa e resistência de plantas.

3. MATERIAL E METODOS

3.1. Procedência e pré-seleção dos frutos

Os pêssegos das cultivares Biuti e Real (*Prunus persica* (L.) Batsch), utilizados no presente trabalho, foram colhidos na Estação Experimental da EPAMIG localizada no Município de Caldas, sul de Minas Gerais. O município situa-se a 1150 metros de altitude e apresenta como coordenadas 21°55' S, 46°23' W. O ano de 1987, segundo registro meteorológico da Estação apresentou temperatura média anual de 18,73°C e pluviosidade de 1469,4mm.

Os frutos foram pré-selecionados, considerando-se ausência de injúrias visuais e infecções, presença de pedúnculo e uniformidade de tamanho, textura e cor.

Os pêssegos, em número de 375 por cultivar foram acondicionados em caixas de papelão ventiladas (235 x 245 x 80mm) com capacidade para aproximadamente 3Kg de frutos, foram transportados para Lavras, sul de Minas Gerais, no mesmo dia da colheita sendo imediatamente ensaiados no laboratório de

Bioquímica de Frutos e Hortalças, no DCA da Escola Superior de Agricultura de Lavras.

3.2. Coleta e preparo das amostras

Os frutos na maturidade comercial foram coletados em cada planta considerando-se sua posição em relação aos pontos cardeais, altura do terço médio da mesma na parte externa da copa, segundo técnica de coleta aconselhada por Hulme e colaboradores citados por TEIXEIRA (82).

No laboratório, foram selecionados por uniformidade de cor e tamanho eliminando-se aqueles com injúrias mecânicas, imersos em solução de hipoclorito de sódio a 1%, por 3 minutos e secos em meio ambiente, com auxílio de ventilação.

Foram considerados dois ensaios. Para o estudo enzimático foram avaliados os frutos das duas cultivares, com e sem injúria mecânica, submetidos a sete tempos de cura, constituindo-se num fatorial $2 \times 2 \times 7$ com 28 tratamentos, num delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Para o estudo de compostos fenólicos, utilizou-se os frutos das duas cultivares com e sem injúria mecânica, submetidos a quatro tempos de cura constituindo-se num fatorial $2 \times 2 \times 4$ com 16 tratamentos num delineamento inteiramente casualizado com três repetições. A unidade experimental constou de dez frutos, num total de 750 frutos.

3.3. Análises físicas e físico-químicas dos frutos

Nos frutos integros e sem injúrias, para verificar o estágio de maturação foram realizadas as seguintes análises:

- Peso do fruto (g) e peso do caroço (g), por pesagem individual em balança semi-análítica

- Relação polpa/caroço, dividindo-se a diferença entre o peso do fruto e do caroço pelo peso deste último.

- Peso específico, dividindo-se o peso do fruto pelo volume de água deslocado em proveta graduada.

- Textura ($1/\text{pol}^2$), medida com penetrômetro Magness Taylor, convertida e expressa em Newton, por multiplicação do valor em $1/\text{pol}^2$ pela constante 4,11.

- Acidez titulável, medida através da titulação da amostra com NaOH 0,1N sendo o resultado expresso em ácido cítrico partindo da relação: 1ml de NaOH 0,1N = 0,0064g de ácido cítrico, segundo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (44).

- pH obtido por potenciometria, em eletrodo de vidro, segundo técnica descrita pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (44).

- Sólidos solúveis, foram determinados pelo refratrômetro de ABBE, segundo técnica descrita pela AOAC (04).

TABELA 1 - Teores médios dos componentes físicos, químicos e físico-químicos das cultivares de pêssego Biuti e Real, após a colheita.

DESCRIÇÃO	CULTIVAR	
	Biuti	Real
Peso do fruto (g)	104,28	90,23
Peso do caroço (g)	5,99	5,70
Diâmetro (cm) longitudinal	5,91	5,78
Diâmetro (cm) transversal	5,76	5,48
Textura (Newton)	79,40	78,54
Peso específico	19,04	18,94
Acidez Titulável (% Ac. cítrico)	0,736	0,678
Sólidos solúveis (%)	16,60	16,60
pH	3,73	3,83
polpa/caroço	16,40	14,30
Sólidos solúveis/acidez	22,50	24,50

3.4. Técnica de ferimento mecânico

Os frutos foram separados ao acaso em grupos de 10 e acondicionados em bandeijas plásticas (20x14cm). Parte dos grupos foi ferida mecanicamente (tratamento com injúria) e a outra não foi ferida (grupo controle).

A injúria mecânica foi realizada assepticamente em capela de fluxo contínuo, utilizando-se um estilete (2mm de diâmetro x 2mm de comprimento) apresentado na Figura 3. O fruto

foi injuriado em quatro locais equidistantes em sua superfície, sendo duas injúrias mais próximas ao pedúnculo e duas opostas a ele. Os ferimentos foram umidecidos com água destilada estéril com auxílio do mesmo estilete, afim de evitar o ressecamento destes tecidos. A Figura 5 apresenta uma ilustração dos tecidos de pêsego.

3.5. Armazenamento dos frutos e obtenção dos discos

Os frutos, com e sem injúrias, foram armazenados em ambiente com temperatura controlada (20°C) e umidade relativa do ar 75%. Foram cortados discos de tecidos com 1cm de diâmetro e 4mm de profundidade ao redor dos ferimentos, nos frutos injuriados. Discos de mesma dimensão e em locais similares àqueles da injúria, foram retirados dos frutos não feridos. Os discos foram retirados após 0, 6, 12, 18, 24, 36 e 48 horas de cura, utilizando-se um perfurador inoxidável (Figura 4).

Uma vez retirados, os discos foram imediatamente colocados sob nitrogênio líquido e armazenados em freezer (-18°C) até a realização das análises químicas e enzimáticas. Para as análises histoquímicas, uma outra parte dos discos foi armazenada em solução de formalina-aceto-álcool (FAA) obtida a partir da mistura de álcool etílico 70%, ácido acético glacial e formalina numa proporção de 90:5:5 partes, respectivamente.

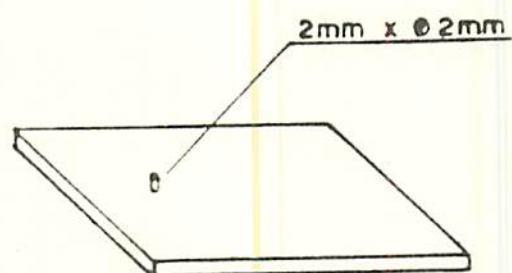


Figura 3 - Suporte com estilete utilizado para injuriar mecanicamente os frutos.

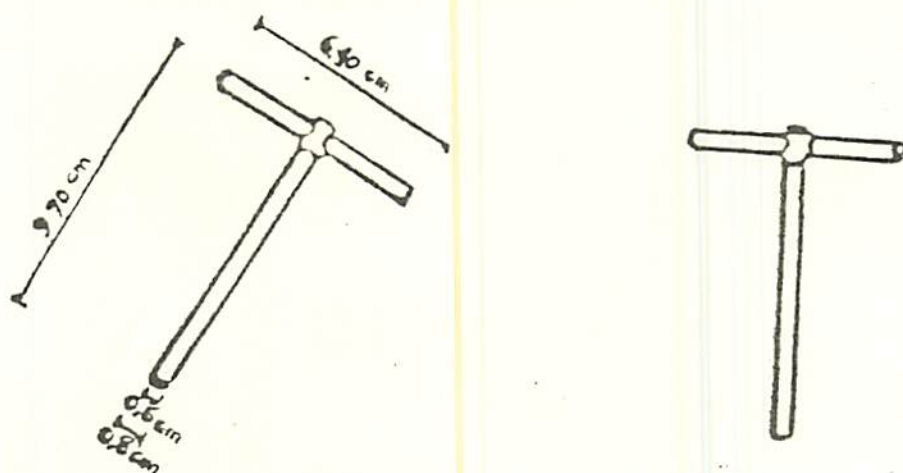


Figura 4 - Perfurador utilizado para retirar os discos de tecidos dos frutos.

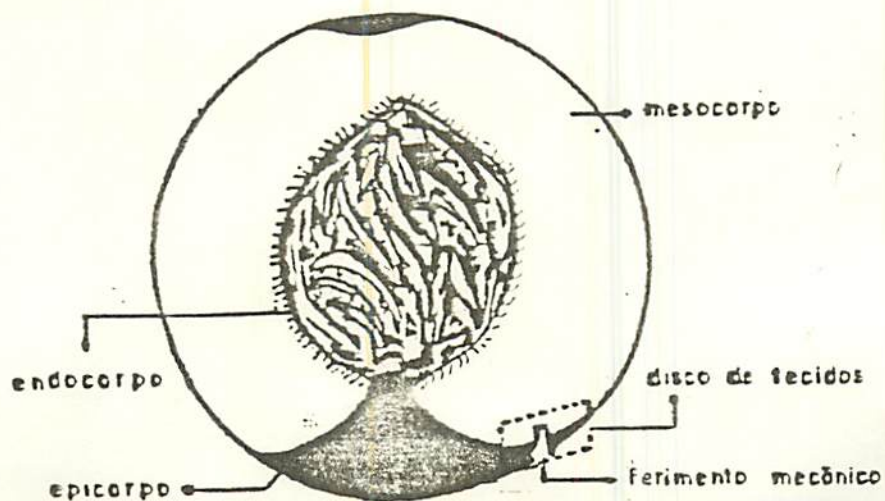


FIGURA 5 - Esquema de pêssego representando os tecidos e a profundidade da injúria.

3.6. Análise química e enzimática nos discos de tecidos dos frutos.

a) Compostos fenólicos totais

Foram extraídos os compostos fenólicos dos discos de tecidos dos pêssegos 'Biuti' e 'Real', com e sem injúrias, utilizando-se três líquidos extratores (metanol puro, metanol 50% e água destilada), diluindo-se uma parte do material em cinco partes de cada líquido extrator. A extração foi realizada sob refluxo por 15 minutos em chapa elétrica, com exceção do material extraído com água. Os extratos obtidos foram filtrados à vácuo e evaporados até 5ml, aproximadamente, em chapa elétrica. Os resíduos foram diluídos a 10ml e neles determinados os teores de compostos fenólicos utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, descrito por FOLIN & CIOCALTEAU (31).

b) Atividade da peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PFO).

As atividades das enzimas POD e PFO foram determinadas em extratos obtidos dos discos de tecidos de pêssegos congelados, com e sem injúria. A extração foi realizada a 4°C triturando-se 2g de discos de tecidos em 5ml de tampão fosfato 0,1M pH 6.2, mais PVP (1%p/p) como capturador de fenólicos, em homogeneizador Potter por 2 minutos. O extrato foi centrifugado a 10000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado com pipeta de Pasteur e filtrado para remover partículas flutuantes. O filtrado obtido foi ensaiado em triplicata para a atividade da POD e PFO.

Para determinação da atividade da POD foi utilizado 4,3ml de tampão-acetato de sódio 0,01M pH 6.0, contendo 0,5% de guaiacol (como substrato), 0,5ml de peróxido de hidrogênio a 0,1% e o extrato enzimático num volume de 0,2ml. A determinação da atividade da PFO foi realizada utilizando-se 4,4ml de tampão-fosfato 0,1M, pH 6.2, 0,5ml de catecol 0,2M e 0,1ml do extrato enzimático.

O aumento de absorvância foi seguido por 5 minutos a 470 nm para POD, e 420 nm para PFO.

Uma unidade de atividade da POD e PFO foi definida como um aumento de 0,1 na unidade de absorvância por minuto, a 470 e 420 nm, respectivamente, segundo FLURKEY & JEN (30).

c) Atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL)

A atividade da FAL foi determinada a partir do doseamento da quantidade de ácido cinâmico formado, segundo método descrito por ZUCKER (95), HYODO, KURODA & YANG (42) e HYODO & YANG (43).

A extração foi realizada triturando-se 3g de discos de tecidos de pêssegos congelados, com 15ml de tampão borato 50mM contendo 60microlitros de 2-Mercaptoetanol e 0,3g de PVP, pH 8,5, a 4°C em homogeneizador Potter.

O extrato foi centrifugado a 25000g por 15 minutos a 4°C. No sobrenadante (extrato enzimático) foi medida a atividade da FAL misturando-se 5ml do extrato com 5 ml do tampão-borato 50mM, em banho-maria 40°C por 5 minutos, adicionando-se 0,55ml de L-fenilalanina 100mM. A absorvância desta mistura reagente foi

medida a 290 nm ao ser adicionada a L-fenilalanina e após a incubação desta mistura reagente em banho-maria 40°C por 1 hora. Uma unidade de atividade enzimática (UA/h) foi definida como a quantidade de FAL que produz um aumento de 0,01 unidade/h na absorção a 290nm. Esta mudança na absorção é equivalente à formação de 1 μ M de ácido cinâmico/hora.

d) Análise histoquímica dos discos de tecidos de pêssego

Os discos de tecidos dos pêssegos, cortados ao redor das áreas com e sem injúria, foram fixados em solução de FAA, desaerados (utilizando bomba de vácuo) e desidratados. A desidratação foi realizada passando-se os discos de tecidos de pêssego por soluções de álcool etílico, contendo progressivamente concentrações maiores, até álcool etílico 100%. Em seguida, os discos foram passado para uma mistura (1:1) de álcool 100% mais álcool t-butílico (clarificação) e para álcool t-butílico puro, passando para uma mistura (1:1) de álcool t-butílico e parafina, mantido a 56°C e finalmente transferido para parafina pura. As trocas dos tecidos para soluções alcólicas foram realizadas em intervalos de 48 horas e para a mistura álcool t-butílico-parafina em 24 horas (34, 47 e 58). Os tecidos foram seccionados a 10 μ de espessura utilizando-se micrótomo rotatório Spencer "820" American Optical. As fitas de tecidos parafinados foram fixadas sobre lâminas, desparafinadas, coradas e analisadas em microscópio óptico através de objetivas de 3.2 e 10 e ocular de 40x.

Para a identificação dos detalhes celulares, foi realizada a coloração de Safranina-Fast Green, que cora em verde o citoplasma e a parede celular não lignificada e, em vermelho, o núcleo, substâncias fenólicas e elementos lignificados, JENSEN (47).

Os compostos fenólicos foram identificados pela coloração verde utilizando-se testes com cloreto férrico, GAHAN (36), e pelo Nitroso teste, descrito por REEVE (68), no qual o catecol e o ácido clorogênico coram-se em vermelho-cereja escuro, que é persistente por uma hora; os fenóis apresentam cor amarelo-claro e o ácido tânico amarelo-marrom e a mistura de fenólicos coram-se de vermelho-cereja a marrom.

A suberina foi investigada utilizando-se a coloração com Sudan IV, descrita por RAWLINS & TAKAHASHI (67).

A formação da lignina foi investigada através das técnicas de Azul de O-toluidina, SAKAI (75), na qual os tecidos lignificados e suberizados coram-se em azul-esverdeado, a mistura de fenólicos em azul, as paredes celulares não lignificadas coram-se em vermelho púrpura, o citoplasma e o RNA em púrpura e o DNA aparece em azul-esverdeado; reação de Schiff, JENSEN (47) e floroglucinol-HCL, FAULKNER & KIMMIS (29).

3.7. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância no Centro de Processamento de Dados da ESAL.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características dos pêssegos 'Biuti' e 'Real', utilizados neste experimento, são apresentados na Tabela 1. Através destes resultados e dos valores obtidos da relação sólidos solúveis/acidez, para os pêssegos 'Biuti' (22,5) e 'Real' (24,5), pode-se considerar que os frutos foram colhidos no estágio de maturação comercial. Tal relação, sólidos solúveis/acidez é um dos parâmetros comumente utilizados para avaliar o grau de maturação dos frutos, visto que, geralmente, com o avanço da maturação ocorre um aumento no teor de sólidos solúveis e decréscimo na acidez titulável, Salunkhe e colaboradores citados por TEIXEIRA (82).

4.1. Atividade da peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PFO)

O efeito da injúria mecânica sobre a atividade da POD e PFO durante o período de cura encontram-se nas Tabelas 2 e 3 e Figuras 6 e 7, respectivamente.

A atividade das enzimas, POD e PFO, nos tecidos integros dos pêssegos de ambas cultivares, apresentou uma leve e gradual diminuição após manutenção a 20°C e 75%UR por um período

de 48 horas.

Entretanto, nos tecidos com injúrias, de ambas cultivares, este comportamento foi modificado havendo um aumento tipo parabólico na atividade das enzimas durante o período de cura de 48 horas a 20°C e 75%UR.

Nos tecidos injuriados, a maior atividade da POD ocorreu no período de cura de 24 horas, na 'Biuti' e 'Real', sendo nestes tempos de cura observados os valores de 22,16UAmim.⁻¹g⁻¹ de tecidos para a 'Biuti' e 22,99UAmim.⁻¹g⁻¹ de tecidos para a 'Real'.

A enzima PFO apresentou maior atividade em torno de 24 horas de cura nos tecidos de ambas cultivares. O valor máximo estimado foi de 7,15UAmim.⁻¹g⁻¹ de tecidos para 'Real' e de 7,50UAmim.⁻¹g⁻¹ de tecidos para a 'Biuti'.

Com relação ao comportamento dessas enzimas, no tecido não injuriado, observou-se uma queda em suas atividades que pode ser devido ao amadurecimento do fruto como também uma variação ocorrida dentro de um ou ambos tecidos analisados. A umidade relativa do ambiente e a temperatura a que os pêssegos foram expostos por 48 horas não permitiu um tempo maior de cura face ao amadurecimento dos frutos, observado visualmente após este período. Trabalhos anteriores relatam uma diminuição ou aumento da POD ou PFO durante o amadurecimento dos frutos, bem como uma variação dessa atividade nos diferentes tecidos que constituem os frutos, PRABHA & PATWARDHAN (64), SATAQUE & WOSIACHI (77), Davis citado por BURNETTE (18) e JOHN & DEY (48).

Entretanto, ao se comparar o comportamento da POD e PFO, nos tecidos injuriados das duas cultivares, verificou-se

Tabela 2 - Atividade da POD ($\text{UA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ tecido) observada em tecidos de pêssegos 'Biuti' e 'Real' sem injúria (S) e injuriados mecanicamente (I), durante 48 horas de cura a 20°C e 75% UR.

Tempo de cura (horas)	'Biuti'		'Real'	
	(S)	(I)	(S)	(I)
0	18,65	18,68	20,09	20,11
6	18,46	18,71	19,97	20,83
12	18,22	19,38	19,88	21,57
18	17,79	21,01	19,72	21,92
24	17,59	22,10	19,61	22,99
36	17,50	21,62	19,39	20,78
48	17,30	19,91	19,17	20,45

Tabela 3 - Atividade da PFO ($\text{UA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ tecido) observada em tecidos de pêssegos 'Biuti' e 'Real' sem injúria (S) e injuriados mecanicamente (I), durante 48 horas de cura a 20°C e 75% UR.

Tempo de cura (horas)	'Biuti'		'Real'	
	(S)	(I)	(S)	(I)
0	5,28	5,22	6,02	6,00
6	4,99	5,62	5,93	6,29
12	4,73	6,33	5,84	6,47
18	4,67	7,36	5,63	6,84
24	4,60	7,50	5,53	7,15
36	4,58	6,44	5,48	6,53
48	4,48	5,75	5,39	6,12

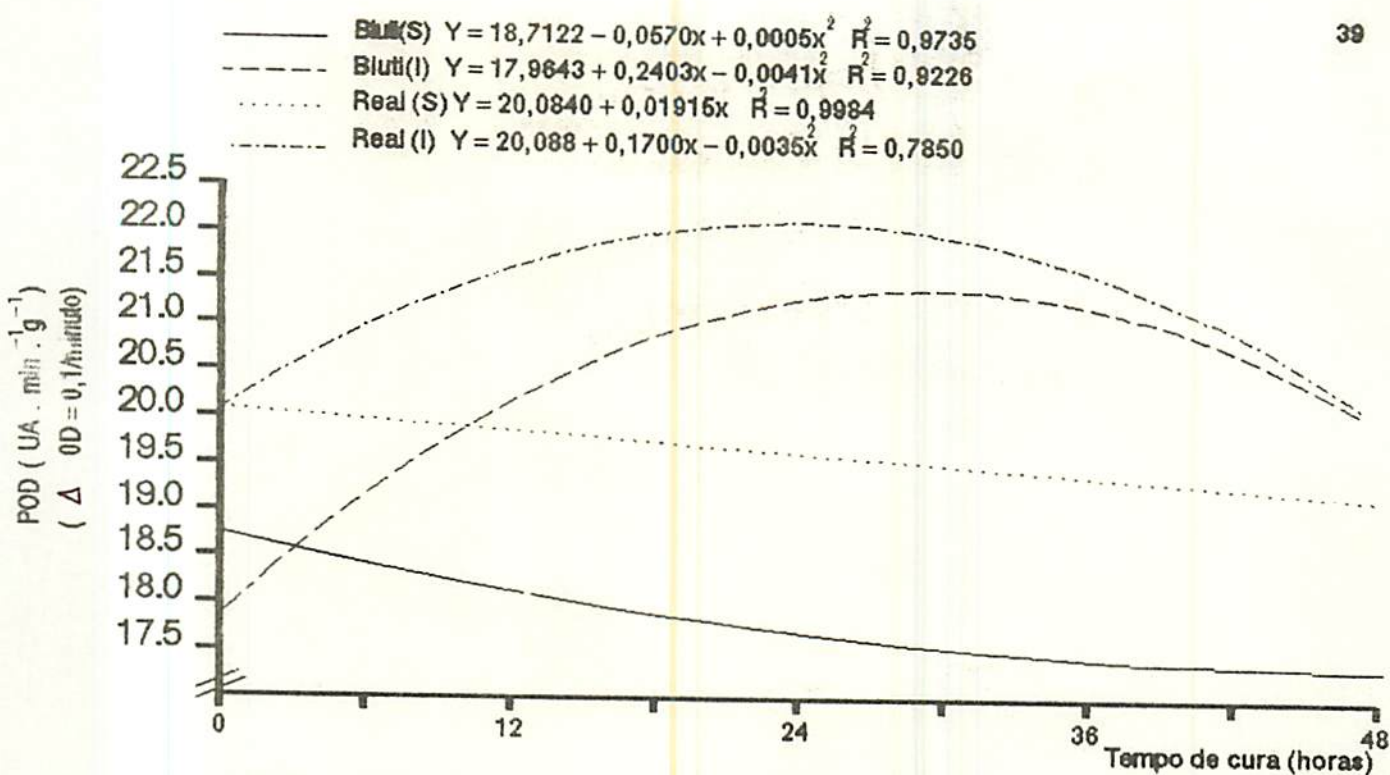


Figura 6 - Curvas de regressao entre atividade POD e os tempos de cura em discos de tecidos de pessego 'Real' e 'Bluti'. A) Com fermento 'Real' (- - -) e 'Bluti' (- - -); B) Sem fermento, 'Real' (.....) e 'Bluti' (—) .

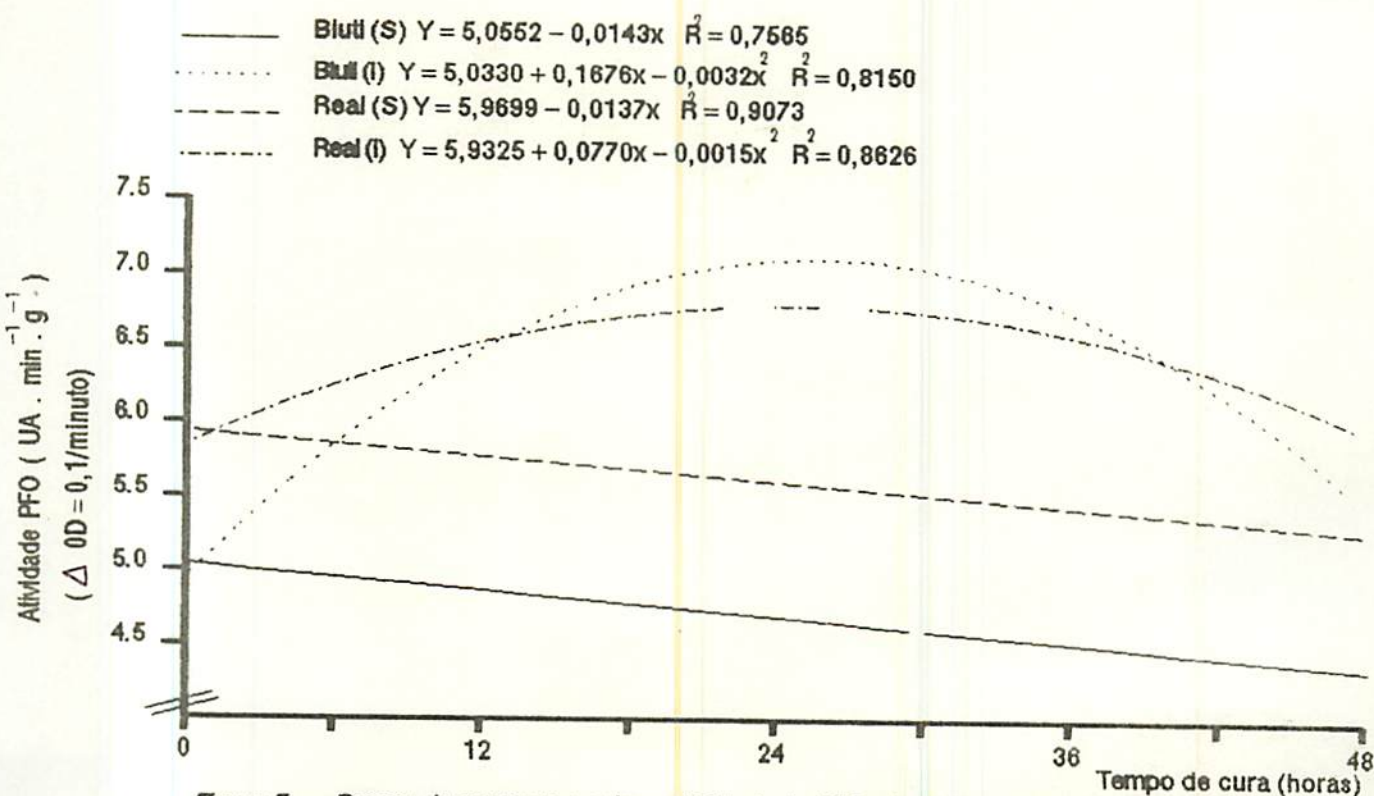


Figura 7 - Curvas de regressao entre a atividade da PFO e tempos de cura em discos de tecidos de pessegos 'Real' e 'Bluti'. A) Com fermento, 'Real' (- - -) e 'Bluti' (.....); B) Sem fermento, 'Real' (- - -) e 'Bluti' (—) .

que as enzimas apresentaram uma resposta às injúrias, elevando suas atividades.

Cada cultivar apresentou respostas características da POD e PFO à injúria. Na 'Real' a POD apresentou maior atividade e em menor tempo de cura do que na 'Biuti'. Entretanto, a PFO apresentou maior atividade na 'Biuti', embora a atividade máxima alcançada tenha ocorrido quase ao mesmo tempo de cura em ambas cultivares.

A indução do aumento das atividades destas enzimas neste trabalho está de acordo com o observado em folhas de milho BIRECKA et alii (10) em folhas e medula de tabaco, BIRECKA, CATALFAMO & URBAN (11), injuriados mecanicamente, como também em folhas de beterraba após injúria e inoculação com *Cercospora*, por RAUTELA & PAYNE (66).

Entre as cultivares, a 'Biuti' mostrou uma resposta mais acentuada ao estímulo da injúria, isto sugere para esta cultivar a existência de mecanismos de defesa que respondem mais prontamente ao ferimento e conduzem à proteção do fruto.

Portanto, o aumento das atividades das enzimas, POD e PFO, no pêssego injuriado pode ser uma resposta do fruto à injúria, embora este aumento não tenha conduzido à formação de lignina nas paredes celulares dos tecidos adjacente à injúria. Não foi detectada uma possível participação da POD na polimerização oxidativa de fenilpropanos até formação da lignina. Assim, o aumento na atividade dessas enzimas pode ter sido devido ao acúmulo de substratos fenólicos nos tecidos injuriados.

A ação da POD e PFO dentro de mecanismos de defesa desenvolvidos pelo vegetal tem sido muito discutida, sendo

ressaltada a ação da POD no mecanismo de proteção do tecido vegetal contra injúrias. Essa proteção estaria relacionada à biossíntese de lignina e/ou suberina no local da injúria mecânica ou sítio de penetração do parasita. A POD, juntamente com a FAL, são enzimas ligadas à biossíntese desses polímeros WHITMORE (90) e GOLDBERG et alii (38). A elevação da atividade da POD também já foi correlacionada com a suberização em raízes de batata injuriadas mecanicamente, BORCHET (16). Além disso, foi observado que com a inibição dessas enzimas os tecidos de folhas de grama tornam-se mais susceptíveis a penetração de parasitas como o *Helminthosporium avenae*, VANCE & SHERWOOD (89).

4.2. Atividade da fenilalanina amônia-liase

Os valores da atividade da FAL durante o período de 48 horas após injúria mecânica, dos tecidos de pêssegos das cvs. Biuti e Real, são apresentandos na Tabela 4 e Fig.08. Os frutos não injúriados não apresentaram variação significativa na atividade da enzima.

Observa-se que a injúria estimulou a atividade da FAL em ambas as cultivares, sendo que a 'Biuti' apresentou maior resposta ao estímulo ocasionado pela injúria.

A atividade da FAL, nas duas cultivares, elevou-se de modo acentuado nas primeiras 6 horas após o ferimento dos tecidos, verificando-se maior atividade em torno de 12 horas após injúria. A partir daí houve um descréscimo na atividade da FAL.

Tabela 4 - Atividade da FAL ($UA \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ tecido) observada em tecidos de pêssegos 'Biuti' e 'Real' sem injúria (S) e injuriados mecanicamente (I), durante 48 horas de cura a $20^{\circ}C$ e 75% UR.

Tempo de cura (horas)	'Biuti'		'Real'	
	(S)	(I)	(S)	(I)
0	85,06	83,89	73,20	72,57
6	86,54	134,70	74,52	98,75
12	82,56	194,30	72,41	124,80
18	78,14	201,26	77,82	102,34
24	78,07	132,82	78,51	88,18
36	80,48	111,97	78,66	88,13
48	80,77	107,26	68,17	86,49

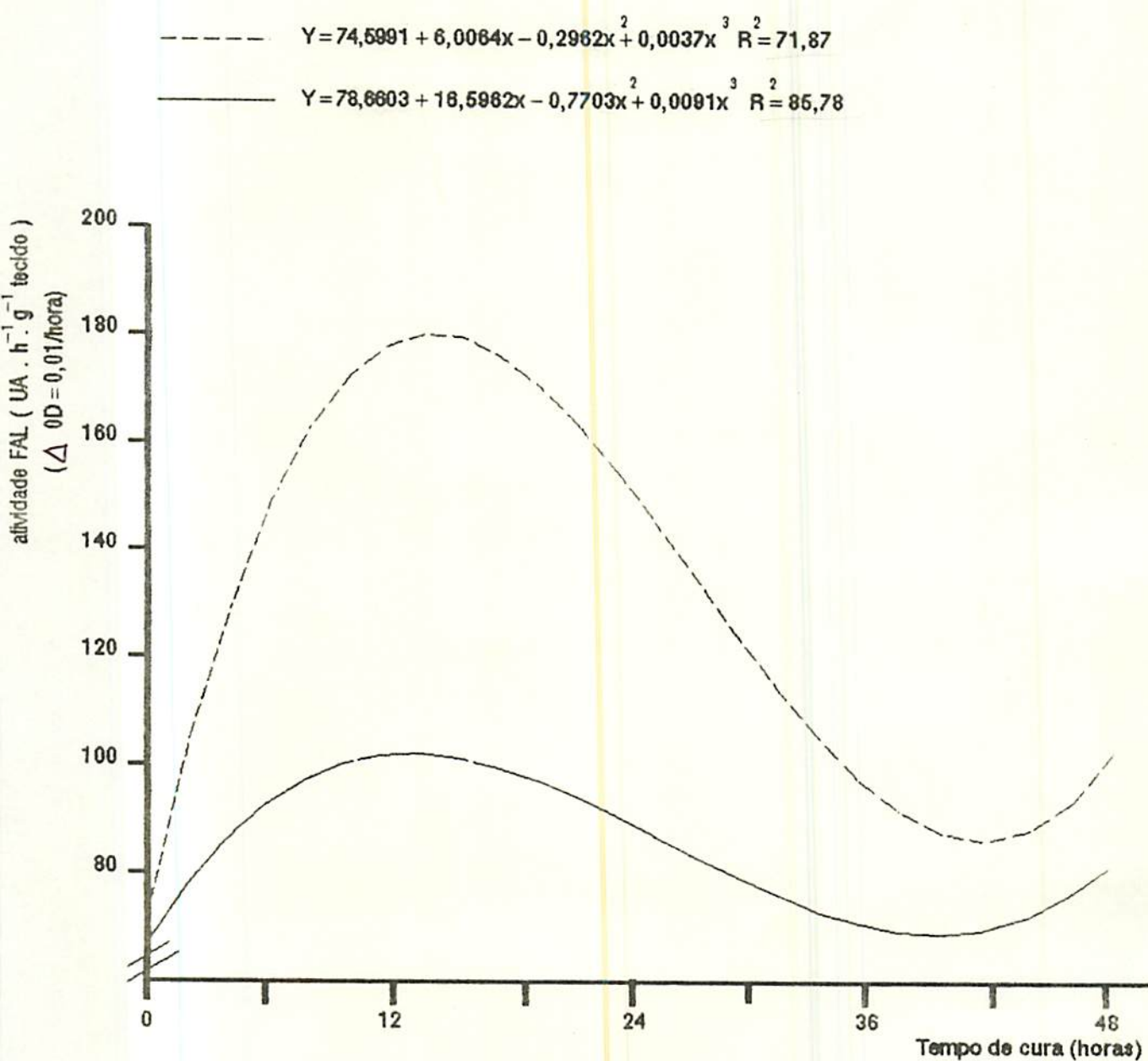


Figura 8 - Curvas de regressão entre a atividade da FAL e tempos de cura nos discos de tecidos de pessegos 'Real' (—) e 'Bluti' (---) Injuriados mecanicamente.

Os dados obtidos são concordantes com os de TANAKA & URITANI (81) e ISMAIL & BROWN (45), que verificaram um aumento na atividade da FAL após injúria mecânica. Segundo TANAKA & URITANI (81), em raiz de batata doce a atividade dessa enzima eleva-se marcadamente em resposta à injúria por corte, chegando ao máximo após 12 horas depois sendo reduzida. Entretanto, ISMAIL & BROWN (45) observaram em laranja 'Valência', um aumento da atividade da FAL durante 72 horas após injúria. No tabaco, que é hospedeiro hipersensível a vírus, foi verificado um estímulo da enzima FAL e da O-metiltransferase (OMT) sendo a atividade fortemente aumentada nas células ao redor da necrose, KOPP et alii, (50). Ainda não está bem esclarecido o mecanismo bioquímico do processo de necrose. Segundo Loebenstein citado por KOPP et alii (50), a necrose é aparentemente precedida por forte reação das células do hospedeiro ao redor da lesão.

Segundo MINAMIKAWA & URITANI (55), tanto o tempo de formação quanto a ativação desta enzima (FAL) estão intimamente ligados ao comportamento da síntese de polifenóis após injúria mecânica e/ou infecção em raiz de batata. Portanto, pode ser considerado que a elevação ocorrida na atividade da FAL seguida do acúmulo de fenólicos, seja uma resposta do pêssigo à injúria mecânica, como foi verificado em laranjas 'Valência', onde a indução da FAL e subsequente acúmulo de fenólicos foram considerados como resultantes da cura ativa que se seguiu à injúria, ISMAIL & BROWN (45)./

O aumento na concentração de compostos fenólicos indica que eles estão sendo sintetizados após injúria ou que estão sendo transportados dos tecidos adjacentes ao ferimento. A

síntese "de novo" de fenólicos poderia ocorrer se a atividade da FAL aumentasse simultaneamente no decorrer do acúmulo de fenóis, segundo GLAZENER (36). Os resultados observados em pêssegos indicam um aumento na atividade da FAL quase que simultâneo ao aumento no teor de compostos fenólicos, sugerindo, portanto, a ocorrência da síntese "de novo" de fenólicos.

4.3. Compostos Fenólicos

Os teores de compostos fenólicos em discos de tecidos de pêssegos com e sem injúria, das cvs. Biuti e Real, são apresentados na Tabela 5 e Fig. 09. Nos tecidos injuriados ocorreu aumento significativo nos teores, o que não foi observado nos tecidos sem injúria.

As duas cultivares apresentaram acúmulos de compostos fenólicos 12 horas após injúria. A cultivar Real apresentou um aumento no teor destes compostos de 13,62%, em 48 horas de cura, enquanto que na cultivar Biuti esse aumento foi de 27,12%, em 24 horas de cura. Após 36 horas da injúria os valores decresceram nos tecidos da cultivar Biuti.

Os fenólicos vegetais incluem uma ampla variedade de compostos, entre eles a lignina e taninos, podendo ser encontrados na parede celular ou dentro dos vacúolos das células vegetais. Porém, quando as células sofrem rupturas por injúria mecânica, os fenóis liberados oxidam-se à quinonas, que por sua vez polimerizam-se e produzem a melanina, uma substância tóxica de cor escura, TORRES et alii (83).

Tabela 5 - Teores de compostos fenolicos (mg de ácido tânico/100g de tecido) observados em tecidos de pêssegos 'Biuti' e 'Real' sem injúria (S) e injuriados mecanicamente (I), durante 48 horas de cura a 20°C e 75% UR.

Tempo de cura (horas)	'Real'		'Biuti'	
	(S)	(I)	(S)	(I)
0	96,71	96,71	97,01	96,81
12	99,22	96,02	101,31	98,05
24	101,22	106,16	99,89	123,07
48	101,39	109,99	100,83	116,63

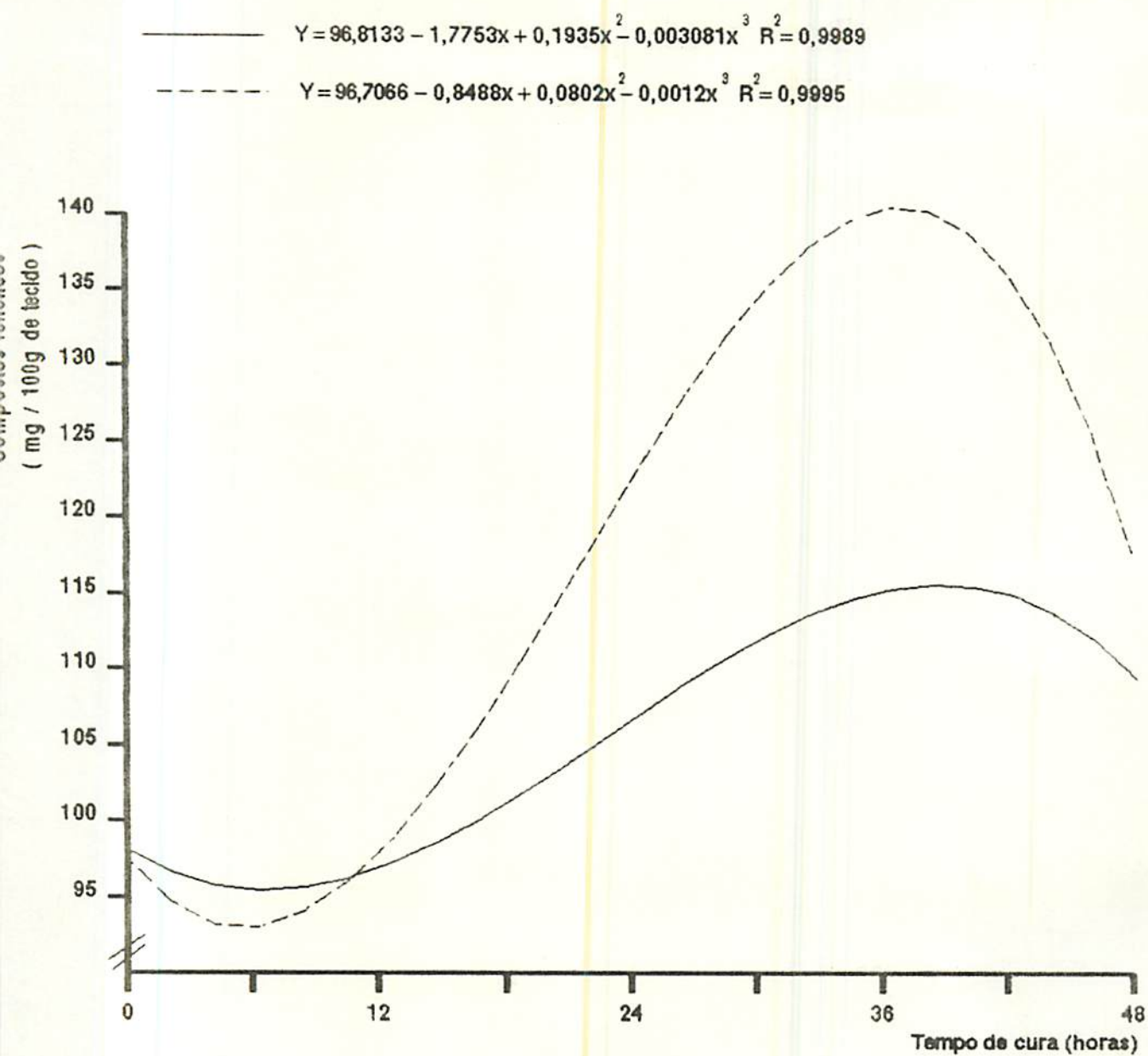


Figura 9 - Curvas de regressão entre os compostos fenólicos totais e tempos de cura em discos de tecidos de pessegos 'Real' (—) e 'Bluti' (- - -) Injuriadas mecanicamente expressas em mg ácido tânico/100g de tecido.

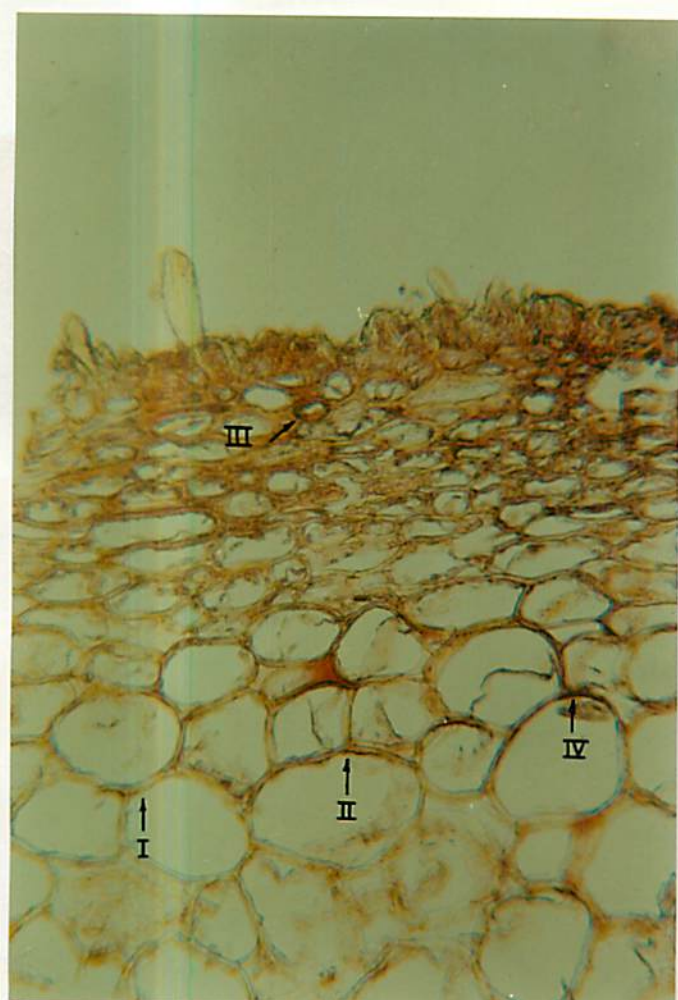
Neste estudo, os compostos fenólicos foram localizados histoquimicamente nas paredes celulares dos tecidos de pêssegos 'Biuti' e 'Real' com e sem injúria, através do Nitroso-teste, REEVE (68), confirmado com teste pelo cloreto ferrico, SAKAI (75). Nos tecidos de pêssegos 'Biuti' e 'Real', injuriados mecanicamente, a camada de células rompidas foi chamada de camada de ferimento. Tal camada apresentou reação positiva para compostos fenólicos após seis horas de ferimento, provavelmente, devido ao fato da quebra da integridade celular que expôs os substratos à ação de enzimas.

Pela coloração desenvolvida nos tecidos não injuriados de pêssegos 'Biuti' e 'Real', através do Nitroso teste, descrito por REEVE (68), foi observado a presença de catecol, ácido clorogênico, ácido tânico e fenóis na epiderme, e no mesocarpo prevaleceram os fenóis (Figura 10a).

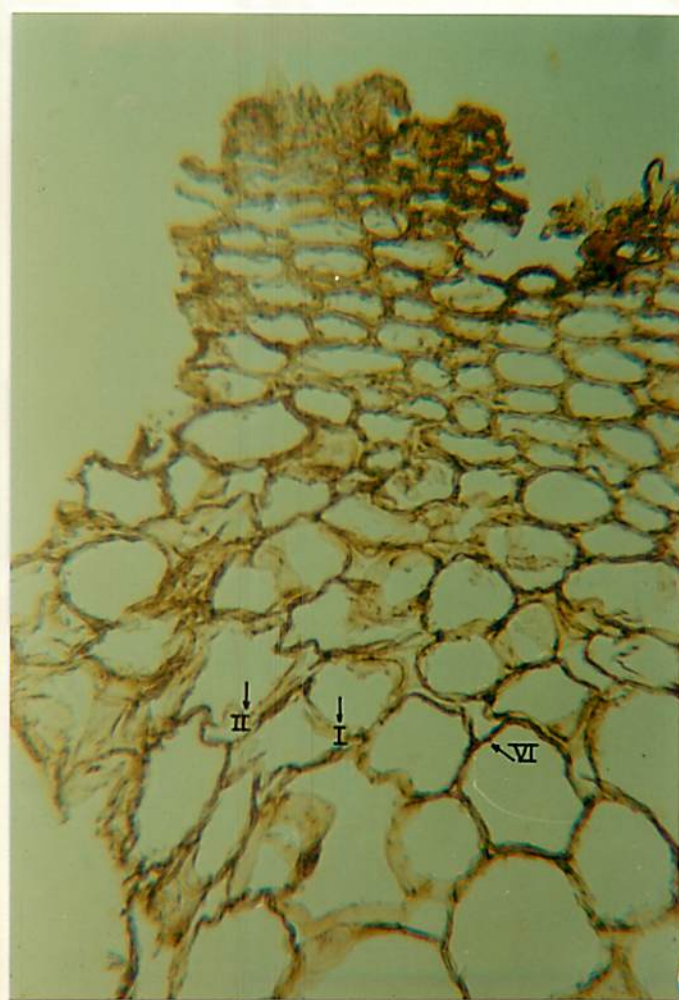
Nos tecidos injuriados de pêssegos de ambas as cultivares, a indicação dada por este teste mostrou um acúmulo, provavelmente de ácido clorogênico e catecol nas paredes celulares adjacentes à camada de ferimento (Figura 10b).

A reação pelo Nitroso-teste, nas camadas de células íntegras que circundam o ferimento, foi visível a partir de 18 e 24 horas, respectivamente, nas cultivares Biuti e Real.

Além disso, foi realizado outro teste utilizando-se o Azul de O-toluidina, que segundo SAKAI (75), permite também a verificação de paredes lignificadas ou suberizadas como também acúmulo de fenólicos. Os tecidos com e sem injúria corados pelo Azul de O-toluidina são apresentados nas Figuras 11a e 11b.



a)



b)

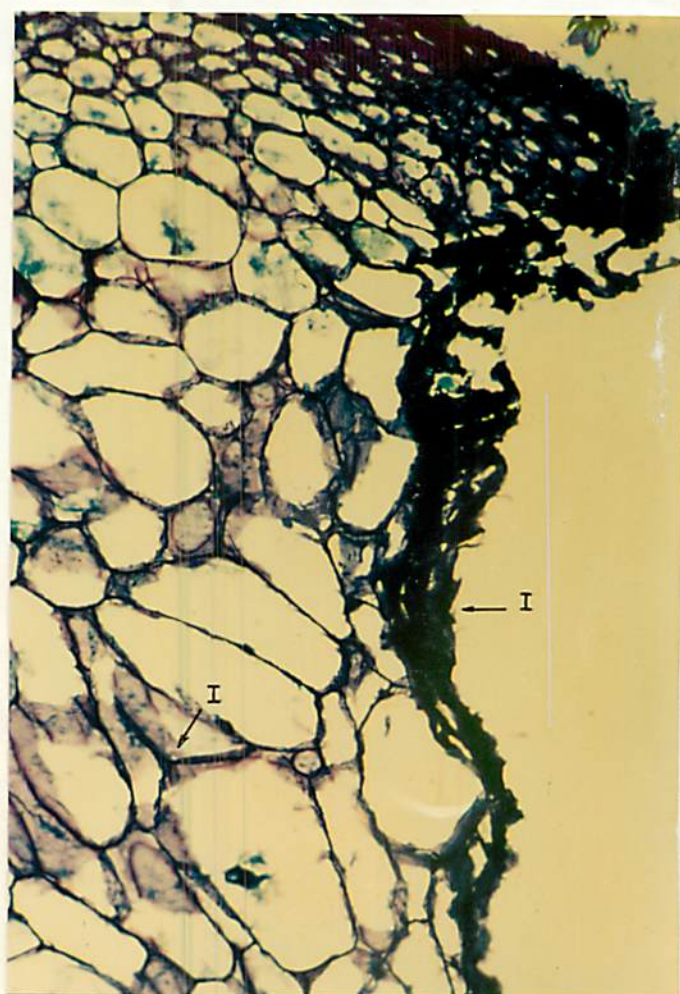
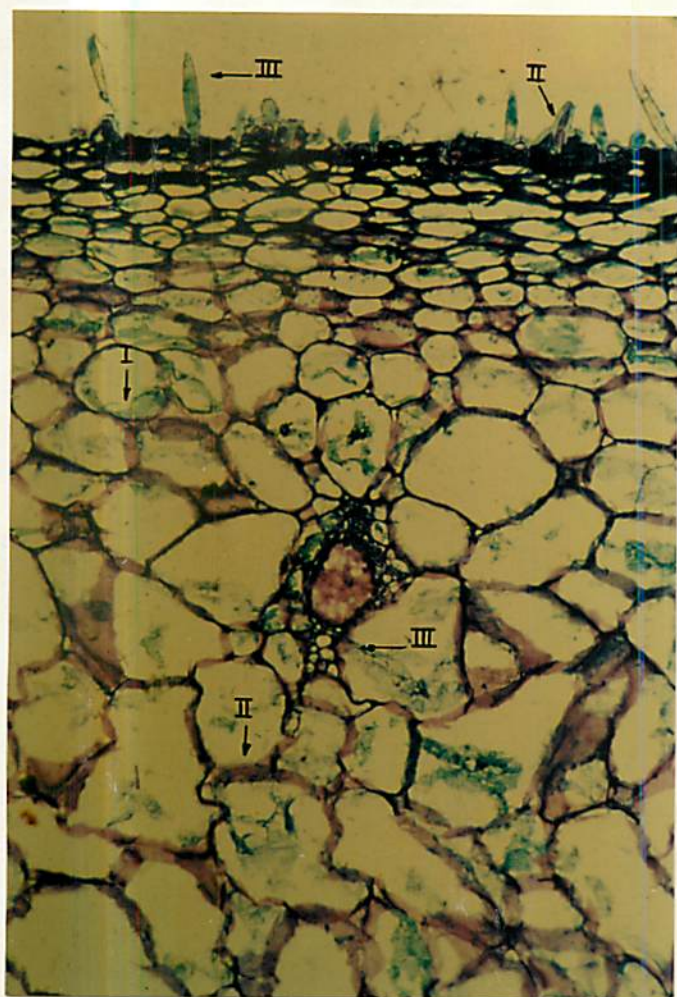
Figura 10 - Fotomicrografia da secção de tecidos do epicarpo e mesocarpo de pêsego pela coloração Nitroso teste: a) tecidos sem injúria; b) tecidos com injúria após 18 horas de cura indicando I Fenóis, II Acido tânico, III Catecol, IV Mistura de Fenólicos. Aumento de 400x.

No tecido injuriado, a camada de ferimento e as paredes celulares ao redor desta camada apresentaram coloração azul acentuada, indicativo de acúmulo de fenólicos, lignina e/ou taninos após 6 e 24 horas de cura, respectivamente. Entretanto, tal coloração não foi observada no tecido não injuriado.

Os detalhes celulares, apresentados nas Figuras 12a e 12b, foram observados através da coloração por Safranina-Fast-Green, dos tecidos sem e com injúria segundo descrito por JENSEN (47). Através desta coloração, verificou-se em algumas paredes das células ao redor da camada de ferimento, uma reação após 36 horas de cura. Esta reação poderia indicar a presença de lignina ou de outros compostos fenólicos, como uma resposta de defesa do fruto ao ferimento, visto que, no tecido não injuriado tal reação não foi verificada.

Entretanto, os testes utilizados para investigação da lignina como Floroglucinol-HCl, FAULKNER & KIMMIS (29), reação com reagente de Schiff, JENSEN (47) e da suberina com Sudan IV, RAWLINS & TAKAHASHI (67), foram negativos, nas duas cultivares, durante o período de 48 horas de cura.

Portanto, a coloração desenvolvida pela Safranina-Fast-Green e Azul de O-toluidina foi, provavelmente, devido a presença de compostos fenólicos diferentes da lignina.



a)

b)

Figura 11 - Fotomicrografia da secção de tecidos do epicarpo e mesocarpo de pêssego pela coloração Azul de O-toluidina: a) tecidos sem injúria; b) tecidos com injúria após 24 decura, indicando I Substâncias fenólicas, II Paredes celulares não lignificadas, III Elementos lignificados. Aumento de 400x.

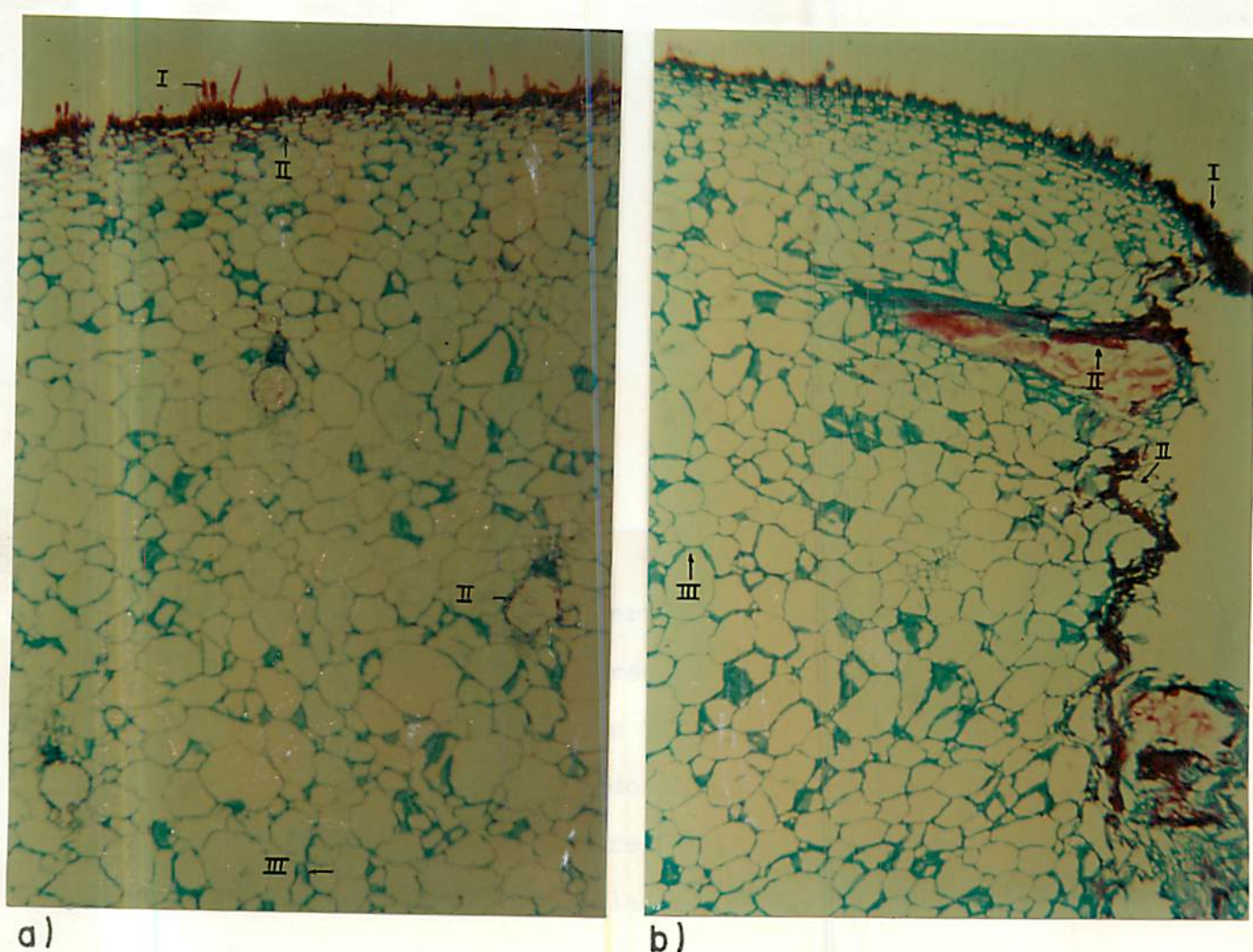


Figura 12 - Fotomicrografia da secção de tecidos do epicarpo e mesocarpo de pêsego, pela coloração Safrarina-Fast-Green: a) tecidos sem injúria; b) tecidos com injúria após 36 horas de cura, indicando: I Cutícula e elementos lignificados, II Mistura de fenólicos, III Paredes celulares não lignificadas. Aumento de 128x.

'Biuti' e 'Real' não foi observada durante as 48 horas de cura. Entretanto, BORCHET (16) e DEAN & KOLATTUKUDY (24), verificaram, respectivamente, em tecidos de raiz de batata e tomate (após remoção do tecido que continha a cutícula), suberização ocorrida após um período longo de cura que foi de 4 dias para batata e 14 dias para o tomate.

Os resultados da observação qualitativa do acúmulo de compostos fenólicos nas paredes celulares dos tecidos injuriados, são apresentados nas Tabelas 06 e 07. Os compostos fenólicos acumularam-se no tecido injuriado desde as primeiras horas após injúria, não ocorrendo nenhuma lignificação ou suberização das paredes das células ao redor do ferimento.

A cv. Biuti apresentou maior acúmulo de compostos fenólicos, do que a cv. Real, nas paredes celulares dos tecidos ao redor da injúria, como foi verificado pelo Nitroso-teste e teste com Cloreto férrico.

A síntese de fenólicos foi mais intensa nas primeiras camadas de células adjacentes ao ferimento, em ambas cvs. como pode ser verificado nas Figuras 10 e 11. Após 48 horas de cura, cerca de 8 camadas apresentaram resposta de síntese.

A suberização dos tecidos injuriados de pêssegos 'Biuti' e 'Real' não foi observada durante as 48 horas de cura. Entretanto, BORCHET (16) e DEAN & KOLATTUKUDY (24), verificaram, respectivamente, em tecidos de raiz de batata e tomate (após remoção do tecido que continha a cutícula), suberização ocorrida após um período longo de cura que foi de 4 dias para batata e 14 dias para o tomate.

TABELA 6 - Reações de coloração da parede celular dos tecidos de pêssego 'Biuti' injuriados mecanicamente, após tempos de cura a 20°C e 75% UR.

Corante	Tempo de cura (horas)							
	CNF	0	6	12	18	24	36	48
Cloreto férrico (fenólicos)	-	-	±	±	+	+	+	+
Floroglucinol-HCl (lignina)	-	<	-	-	-	-	-	-
Nitroso teste (fenólicos)	<	<	±	±	+	+	+	++
Azul de O-toluidina (lignina)	<	<	-	-	-	±	±	±
Safranina-Fast-Green (detalhes celulares)	<	<	-	-	-	-	±	±
Reagente de Schiff (lignina)	-	<	-	-	-	-	-	-
Sudan IV (suberina)	-	<	-	-	-	-	-	-

Intensidade de cor:

Reação ausente ou idêntica ao CNF:	(-)
Reação significativa mas não associada a parede celular:	(<)
Reação positiva fraca:	(±)
Reação positiva:	(+)
Reação fortemente positiva:	(++)
(CNF) Controle não ferido	

TABELA 7 - Reações de coloração da parede celular dos tecidos de pêssegos 'Real' injuriados mecanicamente, após tempos de cura a 20°C e 75% UR.

Corante	Tempo de cura (horas)							
	CNF	0	6	12	18	24	36	48
Cloreto férrico (fenólicos)	-	-	±	±	±	+	+	+
Floroglucinol-HCl (lignina)	-	<	-	-	-	-	-	-
Nitroso teste (fenólicos)	<	<	±	±	±	+	+	++
Azul de O-toluidina (lignina)	<	-	-	-	-	±	±	±
Safranina-Fast-Green (detalhes celulares)	<	-	-	-	-	-	±	±
Reagente de Schiff (lignina)	<	-	-	-	-	-	-	-
Sudan IV (suberina)	-	<	-	-	-	-	-	-

Intensidade de cor

Reação ausente ou idêntica ao CNF:	(-)
Reação significativa não associada à parede celular:	(<)
Reação positiva-fraca:	(±)
Reação positiva:	(+)
Reação positiva-forte:	(++)

(CNF) - Controle não ferido

BROWN, ISMAIL & BARMORE (15) verificaram boa produção e acumulo de lignina no flavedo de citros, a 30°C e UR de 90%, 12 horas após o ferimento. Entretanto, no flavedo mantido sob UR menor que 70% foi observada pequena deposição de material-tipo lignina nas paredes celulares, o que foi associado à dessecação das células ao redor da injúria.

O rompimento das estruturas dos tecidos do pericarpo facilita a perda d'água decorrente do equilíbrio estabelecido pelo gradiente hidrico do fruto (85-95%) e do meio ambiente (70%), visto a periderme agir como barreira protetora entre esta troca hidrica.

Nos discos de tecidos de pêssegos 'Bluti' e 'Real' esta dessecação foi prevenida pelo umidecimento da injúria com água destilada esterelizada, como realizaram (11, 71, 88, 95).

5. CONCLUSOES

Nas condições experimentais utilizadas conclui-se que:

- A injúria mecânica induziu um aumento na atividade das enzimas, POD e PFO, nos tecidos de ambas cultivares estudadas, apresentando um pico de atividade em torno de 24 horas após o ferimento dos tecidos. A atividade da PFO foi maior nos tecidos de pêssegos 'Biuti' injuriados.

- A atividade da FAL, nos tecidos injuriados de ambas cultivares, começou a elevar-se 6 horas após o ferimento e alcançou um pico máximo de atividade em torno de 12 horas de cura, com maior atividade na cv. Biuti.

- O aumento na atividade da FAL foi coincidente com um aumento no teor de compostos fenólicos.

- Os teores de compostos fenólicos não variaram nos tecidos do epicarpo e mesocarpo de pêssegos sem injúria, de ambas cultivares, durante o período de cura.

- Os tecidos do epicarpo e mesocarpo de pêssegos 'Biuti' e 'Real' apresentaram aumento no teor de compostos fenólicos, com um pico máximo em torno de 24 horas de cura.

- Nos tecidos injuriados de pêssegos 'Biuti' foi verificado maior quantidade de compostos fenólicos do que nos tecidos injuriados de pêssegos 'Real'.

- Nos tecidos do epicarpo e mesocarpo injuriados foi verificado, através de testes histoquímicos específicos, acúmulo de compostos fenólicos nas paredes das células ao redor da injúria após 12 horas de cura, em ambas cultivares. Não foi observado, histoquimicamente, acúmulo de lignina ou suberina nestas paredes celulares.

SUGESTOES

Este estudo ilustra a necessidade de pesquisas a cerca do controle dos processos bioquímicos induzidos por injúria no tecido de pêssego. Sugerimos o estudo sobre os mecanismos controladores do aumento da atividade de enzimas, após injúria e/ou infecção, através do uso de inibidores metabólicos, métodos imunológicos, além de testes envolvendo biologia molecular.

6. RESUMO

No presente trabalho, estudaram-se as modificações ocorridas nos tecidos do epicarpo e mesocarpo de pêssegos 'Biuti' e 'Real' (*Prunus persica* (L.) Batsch), colhidos na maturidade comercial. Os frutos foram selecionados, lavados com água, imersos em hipoclorito de sódio a 1%, por três minutos e secos ao ar. Os pêssegos foram injuriados mecanicamente com auxílio de um estilete e submetidos a um período de 48 horas de cura a 20°C e 75% UR.

Após 0,6,12,18,24,36 e 48 horas de cura foram retirados discos de tecidos ao redor das injúrias, nos quais analisou-se o teor de compostos fenólicos e a atividade da peroxidase (POD), da polifenoloxidase (PFO) e da fenilalaninamônia-liase (FAL). Histoquimicamente, estudou-se o comportamento de compostos fenólicos (lignina e suberina) nas paredes das células ao redor da injúria.

Os resultados observados demonstraram que a injúria mecânica induziu um aumento na atividade enzimática, com pico de atividade em torno de 24 horas de cura para a POD e PFO e, de 12

horas para a FAL, em ambas as cultivares. O teor de compostos fenólicos nos tecidos injuriados aumentou de modo coincidente com o aumento da atividade da FAL.

Estudos histoquímicos revelaram acúmulo de compostos fenólicos, mas não de compostos tipo lignina ou suberina, nas paredes das células adjacentes ao ferimento.

O aumento na atividade das enzimas e o acúmulo de fenólicos nos tecidos injuriados são fatores envolvidos nos mecanismos de defesa, de pêssegos, à injúria mecânica.

7. SUMMARY

MECHANICAL INJURY IN FRUITS TISSUES OF TWO CULTIVARS
OF (*Prunus persica* (L) Batsch) MECHANISM OF WOUND

TOURINO, M.C.C.

CHITARRA, A.B.

CHITARRA, M.I.F.

MACHADO, J.C.

GAVILANES, M.L.

The main objective of this research was to verify effects due to wound healing in the mesocarp and epicarp tissue of peach, cultivars Biuti and Real, harvested at commercial maturity. Fruits were selected, washed with water, dipped during three minutes in 1% sodium hypochlorite and then dried in air. Peaches were mechanically pinched with a special pin, and left for healing for 48 hours at 20°C and 75% relative humidity.

Discs were taken from wounded tissues 0, 6, 12, 18, 24, 36 and 48 hours after healing and analysed for: phenolic

compounds, peroxidase (POD), polyphenoloxidase (PPO) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activities. Phenolic compounds in the wounded cell walls were detected histochemically.

Results indicated that mechanical injury induced increased POD, PPO and PAL activities in both cultivars. Phenolic compounds in the adjacent wounded cell walls were identified histochemically. Lignin and suberin were not detected in tissue sites.

The increase in enzyme activities and phenolic accumulation in wounded tissues was thought to be responsible for the mechanism of defence in peaches mechanical injuries.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

01. AKHUNDOV, R.M.; KULIEV, A.A. & SALÍKOVA, E.G. Effect of ethrel on the o-diphenoloxidase activity and the browning of peach and apple fruits. *Applied Biochemistry and Microbiology*, New York, 16(3):350-4, 1980.
02. ALVARENGA, L.R. & FORTES, J.M. Cultivares de fruteiras de clima temperado. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 11(124):3-23, abr. 1985.
03. AMPOMAH, Y.A. & FRIEND, J. Insoluble phenolic compounds and resistance of potato tuber disc to *Phytophthora* and *Phoma*. *Phytochemistry* Elmsford, 27(8):2533-41, July 1988.
04. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. *Official and tentative methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists*. 2. ed. Washington, 1970 p.205.

05. BAYDOUN, E.A.H. & FRY, S.C. The immobility of pectic substances in injured tomato leaves and its bearing on the identity of the wound hormone. *Planta*, Berlin, 165(2):269-79, Aug. 1985.
06. BELL A.A. Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annual Review Plant Physiology*, Palo Alto, 32:21-81, 1981.
07. BENJAMIN, N.D. & MONTGOMERY, M.W. Polyphenoloxidase of Royal Ann cherries: purification and characterization. *Journal of Food Science*, Chicago, 38(5):799-806, July/Aug. 1973.
08. BIGGS, A.R. Phellogen regeneration in injured peach tree bark. *Annals of Botany*, London, 57(4):463-70, Apr. 1986.
09. BIGGS, A.R. & STOBBS, L.W. Fine structure of the suberized cell walls in the boundary zone and necrophylatic periderm in wounded peach bark. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 64(8):1606-10, Aug. 1986.
10. BIRECKA, H; CATALFAMO, J.L. & GARRAWAY, M. O. Cell wall and protoplast isoperoxidases of corn leaves in relation to cut injury and infection with *Helminthosporium maydis*. *Plant Physiology*, Bethesda, 55(4):607-10, Apr.1975.

11. BIRECKA, H.; CATALFAMO, J.L. & URBAN, P. Cell wall and protoplast isoperoxidases in tobacco plants in relation to mechanical injury and infection with tobacco mosaic virus. *Plant Physiology*, Bethesda, 55(4):611-9, Apr. 1975.
12. ----- & MILLER, A. Cell wall and protoplast isoperoxidases in relation to injury, indol acetic and ethylene effects. *Plant Physiology*, Bethesda 53:569-74, 1974.
13. BLOCK, R. Wound healing in higher plants. *Botanical Review*, New York, 7(3):110-46, Mar. 1941.
14. BROWN, G.E. & BARMORE, C.R. Resistance of healed citrus exocarp to penetration by *Penicillium digitatum*. *Postharvest pathology and micotoxins, Phytopathology*, St Paul, 73(5):691-4, 1983.
15. -----; ISMAIL, M.A. & BARMORE, C.R. Lignification of injuries to citrus fruit and susceptibility to green mold. *Proceedings of Florida State Horticultural Society*, Deland, 91:124-6, 1978.
16. BORCHET, R. Time course and spatial distribution of phenylalanine ammonia lyase and peroxidase activity in wounded potato tuber tissue¹. *Plant Physiology*, Bethesda, 62(5)789-93, Nov. 1978.

17. BOSTOCK, R.M. & STERMER, B.A. Perspectives on wound healing in resistance to pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 27:343-71, 1989.
18. BURNETTE, F.S. Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review. *Journal of Food Science*, Chicago, 42(1):1-6, Jan/Feb. 1977.
19. CAMM, L. & TOWERS, N.G.H. Review article phenylalanine ammonia lyase. *Phytochemistry*, New York, 12:961-73, 1973.
20. CHEN, R.Y.; CHANG, T.-C. & LIU, M.-S. Phenylalanine ammonia - lyase of bamboo shoots. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokio, 52(9):2137-42, Sep. 1988.
21. CLARE, B.; WEBER, D.J. & STAHMANN, M.A. Peroxidase and resistance to *Ceratocystis* in sweet potato increased by volatile materials. *Science*, Washington, 153(1):62-3, July 1966.
22. COSETENG, M.Y & LEE, C.Y. Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *Journal of Food Science*, Chicago, 52(4):985-9, July/Aug. 1985.
23. CRAFT, C.C & AUDIA, W.V. Phenolic substances associated with wound-barrier formation in vegetables. *Botanical Gazette*, Chicago, 123:211-9, 1962.

24. DEAN, B.B. & KOLATTUKUDY, P.E. Synthesis of suberin during wound - healing in jade leaves, tomato fruit, and bean pods. *Plant Physiology*, Washington, 56(3):411-6 Sep. 1976.
25. DICKERSON, D.P., PASCHOLATI, S.F.; HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L.G. & NICHOLSON, R.L. Phenylalanine ammonia-lyase and hydroxycinnamoyl-CoA ligase in maize mesocotyls inoculated with *Helminthosporium maydis* or *Helminthosporium carbonum*. *Physiological Plant Pathology*, New York 25:111-23, 1984.
26. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado. *A cultura do pessegueiro*. Pelotas, 1984. 156p. (Circular, 10).
27. ENGELSMA, G. Photoinduction of phenylalanine deaminase in gherkin seedlings. *Planta*, Berlin, 75:207-19, 1967.
28. FARAGHER, J.D. & CHALMERS, D.J. Regulation of anthocyanin synthesis in apple skin. III. Involvement of phenylalanine ammonia-lyase. *Australian Journal of Plant Physiology*, Victoria, 4:133-41, 1977.
29. FAULKNER, G. & KIMMIS, W.C. Staining reactions of the tissue bordering lesions induced by wounding tobacco Mosaic Virus and tobacco Necrosis Virus in beans. *Phytopathology*, St. Paul, 65:1396-400, 1975.

30. FLURKEY, W.H. & JEN, J.J. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *Journal of Food Science*, Chicago, 43(6):1826-31, Nov/Dec. 1978.
31. FOLIN, D. & CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *Journal Biological Chemistry*, Baltimore, 73:627-50, 1927.
32. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO production yearbook - 1987. Roma, 1987. v 41. n^o 82. p212.
33. FRIEND, J.; REYNOLDS, S.B. & AVEYARD, M.A. Phenylalanine ammonia-lyase, chlorogenic acid and lignin in potato tuber tissue inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiological Plant Pathology*, New York, 3:495-507, 1973.
34. GAHAM, P.S. *Plant histochemistry and cytochemistry*. New York, Academic Press, 1984. 301p.
35. GALEAZZI, M.A.M. Comportamento das polifenoloxidasas em alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, Guatemala, 34(2):269-89, 1984.
36. GLAZENER, J.A. Accumulation of phenolic compounds in cells and formation of lignin-like polymers in cell wall of young tomato fruits after inocubation with *Botrytis cinerea*. *Physiological Plant Pathology*, London, 20:11-25, 1982.

37. GOODWIN, T.W. & MERCER, E.I. Structure and function of the plant cell. In: *Introduction to plant biochemistry*. Oxford, Pergamon Press, 1983. Cap.3, p.18-54.
38. GOLDBERG, R.; PANG, A.; PIERRON, M.; CATESSON AM.; CZANINSKY, I.; FRANCESCH, C. & ROLANDO, C. Investigation of lignification by means of fluorinated analogues of ferrulic acid and coniferyl alcohol. *Phytochemistry*, New York 27(6):1647-51, May 1988.
39. GREEN, N.E.; HADWIGER, L.A & GRAHAM, S.O. Phenylalanine ammonia-lyase, and lignin in wheat inoculated with *Erysiphe graminis f. sp tritici*. *Phytopathology*, St. Paul 65(10):1071-4, Oct. 1975.
40. HAVIR, E.A.; REID, P.D. & MARSH Jr., H.V. Phenylalanine ammonia-lyase (Maize). *Plant Physiology*, Bethesda, 48(2):130-6, Aug. 1971.
41. HIGUCHI, T. Role of phenylalanine ammonia deaminase and tyrase in the lignification of bamboo. *Agricultural and Biological Chemistry Journal*, Tokio, 30(7):667-73, 1966.
42. HYODO, H; KUODA, H. & YANG, S.F. Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene¹. *Plant Physiology*, Bethesda, 62:31-5, 1978.

43. ----- & YANG, S.F. Ethylene-enhanced synthesis of phenylalanine ammonia-lyase in pea seedlings *Plant Physiology*, Bethesda 47(6):765-70, Jun. 1971.
44. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas técnicas de métodos físicos e químicos de alimentos. In: *Normas de qualidade para alimentos*. São Paulo, 1967. v.1, p.10-3.
45. ISMAIL, M.A. & BROWN, G.E. Postharvest wound healing in citrus fruit: induction of phenylalanine ammonia-lyase in injured 'Valencia' orange flavedo. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Mount, 104(1): 126-9, Jan. 1979.
46. JAHNEN, W. & HAHLBROCK, K. Differential regulation and tissue-specific distribution of enzymes of phenylpropanoid pathways in developing parsley seedlings. *Planta*, Berlin, 173(4):453-8, Apr. 1988.
47. JENSEN, W.A. Carbohydrates and cell wall constituents. In: JENSEN, W.A. *Botanical histochemistry*, San Francisco, W.H. Freeman, 1962. p.198-206.
48. JOHN, M.A. & DEY, P.M. Postharvest changes in fruit cell wall. [Review]. *Advances in Food Research*, New York, 30:139-93, 1986.

49. KOLATTUKUDY, P.E. Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science*, Washington, 208(4447):990-1000, May 1980.
50. KOPP, M.; GEOFFROY P. & FRITIG B. Plant disease and the regulation of enzymes involved in lignification. *Plant*, Berlin, 157(2):180-9, Feb. 1983.
51. LEGRAND, M. Phenylpropanoid metabolism and its regulation in disease. In: Callow, J.A., ed. *Biochemical Plant Pathology*. New York, John Wiley & Sons, 1983 p.367-83.
52. LUH, B.S. & PHITHAKPOL, B. Characteristics of polyphenol-oxidase related to browning in cling peaches. *Journal of Food Science*, Chicago, 37(2):264-8, Mar/Apr. 1972.
53. MAYES, W.P. Biologic oxidation. In: HAPER, H.A. *Review of physiological chemistry*. 12 ed. California, Lange Medical Publications, 1969. p.176-9.
54. MIHALYI, K.; VAMOS-VIGYAZO, L.; KISS-KUTZ, N. & BABOS-SZEBENYL, E. The activities of polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables as related to pH and temperature. *Acta Alimentaria*, Budapest, 7(1):57-67, 1978.

55. MINAMIKAWA, T. & URITANI, I. Phenylalanine deaminase and tyrosine deaminase in sliced or black rot-infected sweet potato roots. *Archives of biochemistry and biophysics*, New York, 108:573-4, 1964.
56. MOSED, H.D. & HERRMANN, K. Changes in catechins and hydroxycinnamic acid derivatives during development of apples and pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, 25(3):251-6, Mar. 1974.
57. MOON, G.J.; PETERSON, C.A. & PETERSON, R.L. Structural, chemical and permeability changes following wounding in onion roots. *Journal Canadien of Botanique*, Ottawa, 62(11):2253-9, Nov. 1984.
58. O'BRIAN, T.P. & McCULLY, M.E. *The study of plant structure; principles and selected methods*. Termarcarpi, Pty Melbourne, 1981. 1000p.
59. PALMER, J.K. Banana polyphenoloxidase. Preparation and properties. *Plant Physiology*, Washington, 38(5):508-10, Sep. 1963.
60. PASCHOLATI, S.F.; NICHOLSON, R.L. & BUTLER, L.G. Phenylalanine ammonia lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. *Journal of Phytopathology*, Berlin, 115:165-72, 1986.

61. PAULSON, A.T. VANDERSTOEP, J. & PORRITT, S.W. Enzymatic browning of peaches: effect of gibberelic acid and ethephon on phenolic compounds and polyphenoloxidase activity. *Journal of Food Science*, Chicago, 45(2):341-51, Mar./Apr. 1980.
62. PEARCE, R.B. & RIDE, J.P. Specificity of induction of the lignification response in wounded wheat leaves. *Physiological Plant Pathology*, London, 16:197-201, 1980.
63. PECH, J.C. & FALLOT, J. Les enzymes et la qualité des pêches. *Annales de Technologie Agricole*, 21(1):81-93, 1972.
64. PRABHA, T.N. & PATWARDHAN, M.V. Polyphenoloxidase (PPO) and peroxidase (POD) enzyme activities and their isoenzyme patterns in ripening fruits. *Acta alimentaria*, Budapest, 15(3):199-207, 1986.
65. RAHE, J.E.; KUC, J. & CHUANG, C. Cinnamic acid production as method of assay for phenylalanine ammonia-lyase in acetone powders of *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry*, New York, 9:1009-15, 1970.
66. RAUTELA, G.S. & PAYNE, M.G. The relationship of peroxidase and orthodiphenol oxidase to resistance of sugarbeets to *Cercospora* leaf spot. *Phytopathology*, St. Paul, 60(6):238-45, Jun. 1970.

67. RAWLINS, T.E. & TAKAHASHI, W.N. *Techniques of plant histochemistry and virology*. Milbrae, The National Press, 1952
125p.
68. REEVE, R.M. Histochemical tests for polyphenols in plant tissues. *Stain Technology*, Baltimore, 26(2):91-6, Apr. 1951.
69. REYES, P. & LUH, B.S. Characteristics of browning enzymes in Fay Elberta freestone peaches. *Food technology*, Chicago, 14(11):570-5, Nov. 1960
70. RIDE, J.P. Cell walls and other structural barriers in defence. In: Callow, J.A. ed, *Biochemical Plant Pathology*, New York, John Wiley & Sons, 1983. p.215-35.
71. RIDE, J.P. Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance. *Physiological Plant Pathology*, London, 5:125-34, 1975.
72. RIOV, J.; MONSELISE, S.P & KAHAN, R.S. Effect of gama radiation on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of phenolic compounds in citrus fruit peel. *Radiation Botany*, New York, 8:463-6, 1968.
73. RHODES, M.J.C. Enzyme activities and post harvest change. In: LIEBERMAN, M., ed. *Post harvest physiology and crop preservation*. New York, Plenum Press, 1983. p.111-21.

74. ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. & KLIEWER, W.M. Phenylalanine ammonia-lyase in berries of *Vitis vinifera* L.: extraction and possible sources of error during assay. *American Journal of Enology and Viticulture*, California, 36(4):314-5, 1985.
75. SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin emebbed plant material using Toluidine Blue O. *Stain Technology*, Baltimore, 48:247-9, 1973.
76. SAPERS, G.M.; MATULAITIS, R.M. & BECK, J.A. Dectection of phenilalanine ammonia-lyase in the skin blue berry and cranberry fruits. *Journal of Food Science*, Chicago, 52(1):154-72, Jan./Feb. 1987.
77. SATAQUE E. Y. & WOSIACKI, G. Caracterização da polifenoloxi-dase da maçã. (Malus doméstica, var. Gala). *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, 30(2):287-99, jun. 1987.
78. SCHALLER, A. MIHALYI, K. & VAMOS VIGYAZO, L. Ergebnisse von untersuchungen hinsichtlich der massebezogenen diphenoloxidase-aktivitat in mesocarp verschiedener gelbfleischiger pfirschsorten. *Confructa*, Frankfurt, 23(1/2):11-24, 1978.

79. SCHALLER, A. & VAMOS-VIGYAZO, L. Ergebnisse von untersuchungen hinsichtlich der thermostabilitat von o-diphenol oxidasen desmesocarps verschiedener gelbfleischiger pfirsichsorten. *Confructa*, Frankfurt, 23(314):90-101, 1987.
80. SCOTT, D. Oxidoreductases. In: REED, G., ed. *Enzymes in food processing*, New York, Academic Press, 1975. cap 9, p.219-53.
81. TANAKA, Y. & URITANI, S. Synthesis and turnover of phenylalanine ammonia-lyase in root tissue of sweet potato injured by cutting. *European Journal of Biochemistry*, New York, 73:255-60, 1977.
82. TEIXEIRA, M.C.R. *Parâmetros físicos e químicos de frutos de 10 variedades de pessegueiros (Prunus persica (L) Batsch)*. Lavras, ESAL, 1979, 142p. (Tese MS).
83. TORRES, A.M; MAU-LASTOVICKA, T. & REZAAIYAN, R. Total phenolics high-performance liquid chromatography of phenolic acids of avocados. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, 35(6):921-5, Nov./Dec., 1987.

84. UCHIYAMA, T.; SATO, J. & OGASAWARA, N. Lignification and qualitative changes of phenolic compounds in rice callus tissues inoculated with plant pathogenic fungi. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokio, 47(1):1-10, Jan. 1983.
85. VAMOS-VIGYAZO, L.; MIHALYI, K.; GAJZAGO, I. & NADUDYARI-MARKUS, V. The role of enzyme-substrate ratio in the enzymatic browning of fruit tissue homogenates. *Acta Alimentaria*, Budapest, 6(4):379-88, 1977.
86. VAMOS-VIGYAZO, L.; MIHALYI, K. & SCHALLER, A. Review of the international literature on diphenol oxidase of peach fruits. *Confructa*, Frankfurt, 21(6):234-41, 1976.
87. -----; NADUDYARI-MARKUS, V. & SCHALLER, A. Results of investigations into the rate of enzymatic browning, mass-related diphenol oxidase activity, o-dihydroxy phenol and chlorogenic acid concentrations of the mesocarp from peach fruits. *Confructa*, Frankfurt, 25(5/6):207-16, 1980.
88. VANCE, C.P.; ANDERSON, J.O. & SHERWOOD, R.T. Soluble and cell wall peroxidases in reed canarygrass in relation to disease resistance and localized lignin formation. *Plant Physiology*, Bethesda, 57(6):920-2, June 1976.

89. VANCE, C.P. & SHERWOOD, R.T. Regulation of lignin formation in reed canarygrass in relation to disease resistance. *Plant Physiology*, Bethesda, 57(6):915-9, June 1976.
90. WHITMORE, F.W. Binding of ferulic acid to cell walls by peroxidases of *Pinus elliotti*. *Phytochemistry*, New York, 15(3):375-8, Mar. 1976.
91. WILSON, J.W. & GRANGE, R.L. Regeneration of tissues in wounded stems: A quantitative study. *Annals of Botany* London, 53(4):515-525 April 1984.
92. WONG, T.C.; LUH, B.S. & WHITAKER, J.R. Isolation and characterization of polyphenol oxidase isoenzymes of clingstone peach. *Plant Physiology*, Bethesda, 48(1):19-23, July 1971.
93. WONG, T.C.; ZUCKER, M. & CREASY, L.L. Induction of phenylalanine ammonia-lyase in strawberry leaf disks. *Plant Physiology*, Bethesda, 54(5):659-65, Nov. 1974.
94. ZUCKER, M. Introduction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue^{1,2}. *Plant Physiology*, Bethesda, 40(5):779-84, Sep. 1965.
95. ----- Sequential induction of phenylalanine ammonia-lyase and a lyase inactivating system in potato tuber disks. *Plant Physiology*, Bethesda, 43(3):365-74, Mar. 1968.

APENDICE

QUADRO 1 - Análise de variância para peroxidase (POD), estudando o efeito dos tempos de cura em frutos, de duas cultivares de pessegueiro, com e sem injúria.

Causa de Variação	GL	QM
Tempos: A ₁	(6)	0,3155 **
R. Linear	1	1,8904 **
R. Quadrática	1	0,0006
Desvio de regressão	4	0,0053
Tempos: A ₂	(6)	2,9523 **
R. Linear	1	0,0050
R. Quadrática	1	12,9265 **
Desvio de regressão	4	1,1957 **
Tempos: B ₁	(6)	0,7997 **
R. Linear	1	4,3125 **
R. Quadrática	1	0,3587 **
Desvio de regressão	4	0,0317
Tempos: B ₂	(6)	5,7282 **
R. Linear	1	10,6765 **
R. Quadrática	1	17,1546 **
Desvio de regressão	4	1,6330 **
Cultivar	1	41,0901 **
Injúria	1	76,4001 **
C x I	1	2,7468 **
Erro	56	0,0434

** Significativo ao nível de 1% pelo teste F

A₁ - 'Real' sem injúria

A₂ - 'Real' com injúria

B₁ - 'Biuti' sem injúria

B₂ - 'Biuti' com injúria

QUADRO 2 - Análise de variância para polifenoloxidase (PFO), estudando o efeito dos tempos de cura em frutos, de duas cultivares de pessegueiro, com e sem injúria.

Causa de Variação	GL	QM
Tempos: A ₁	(6)	
R. Linear	1	0,1770 *
R. Quadrática	1	0,9640 **
R. Cúbica	1	0,0698
Desvio de regressão	3	0,0012
		0,0091
Tempos: A ₂	(6)	
R. Linear	1	0,4887 **
R. Quadrática	1	0,0417
R. Cúbica	1	2,4878 **
Desvio de regressão	3	0,0007
		0,1341 **
Tempos: B ₁	(6)	
R. Linear	1	0,2324 *
R. Quadrática	1	1,0549 **
R. Cúbica	1	0,2637
Desvio de regressão	4	0,0702
		0,0019 **
Tempos: B ₂	(6)	
R. Linear	1	2,2255 **
R. Quadrática	1	0,7397 **
R. Cúbica	1	10,9583 **
Desvio de regressão	3	0,0275
		0,6022 **
Cultivar	1	6,3086 **
Injúria	1	29,0519 **
C x I	1	3,0248 **
Erro	56	0,0078

* Significativo ao nível de 5% pelo teste F

** Significativo ao nível de 1% pelo teste F

A₁ - 'Real' sem injúria

A₂ - 'Real' com injúria

B₁ - 'Biuti' sem injúria

B₂ - 'Biuti' com injúria

QUADRO 3 - Análise de variância para fenilalanina amônia-
liase (FAL), estudando o efeito dos tempos de cura
em frutos, de duas cultivares de pessegueiro, com e
sem injúria.

Causa de Variação	GL	QM
Tempos: A ₁	6	45,0215
Tempos: A ₂	(6)	811,6464 **
R. Linear	1	92,7278 **
R. Quadrática	1	1253,0500 **
R. Cúbica	1	2154,2189 **
Desvio de regressão	3	456,6200 **
Tempos: B ₁	6	31,8437
Tempos: B ₂	(6)	5879,2421 **
R. Linear	1	972,8084 **
R. Quadrática	1	16144,9697 **
R. Cúbica	1	13143,2197 **
Desvio de regressão	3	1671,4800 **
Cultivar	1	13372,6611 **
Injúria	1	30386,3574 **
C x I	1	7053,2017 **
Erro	56	22,2327

** Significativo ao nível de 1% pelo teste F

- A₁ - 'Real' sem injúria
A₂ - 'Real' com injúria
B₁ - 'Biuti' sem injúria
B₂ - 'Biuti' com injúria

QUADRO 4 - Análise de variância para compostos fenólicos, estudando o efeito dos tempos de cura em frutos, de duas cultivares de pessegueiro, com e sem injúria.

Causa de Variação	GL	QM
Tempos: A ₁	3	11,1406
Tempos: A ₂	3	523,9921 **
R. Linear	1	864,8174 **
R. Quadrática	1	261,6333 **
R. Cúbica	1	445,5104 **
Tempos: B ₁	3	14,3515
Tempos: B ₂	(3)	143,1836 **
R. Linear	1	363,0538 **
R. Quadrática	1	0,9446
R. Cúbica	1	65,5621 **
Cultivar	1	129,4949 **
Injúria	1	392,5063 **
C x I	1	119,8902 **
Erro	32	5,6721

* Significativo ao nível de 1% pelo teste F

A₁ - 'Biuti' sem injúria

A₂ - 'Biuti' com injúria

B₁ - 'Real' sem injúria

B₂ - 'Real' com injúria

NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (NMR)
SPECTROSCOPY.
↑