UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

**Produção de compostos voláteis característicos do aroma em mamões
(*Carica papaya* L. cv 'Golden') tratados com metil jasmonato e
armazenados a baixa temperatura.**

Deborah Oliveira De Fusco

Dissertação para
obtenção do grau de MESTRE
em Ciência dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Purgatto

São Paulo

2015

Deborah Oliveira De Fusco

Produção de compostos voláteis característicos do aroma em mamões (*Carica papaya* L. cv 'Golden') tratados com metil jasmonato e armazenados a baixa temperatura.

Comissão Julgadora
da Dissertação para obtenção
Título de “MESTRE”

Presidente/Orientador

Eduardo Purgatto

1º examinador

Angelo Pedro Jacomino

2º examinador

Roberta Guedini der Agopian

São Paulo, 24 de fevereiro de 2015.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

De Fusco, Deborah Oliveira
D313p Produção de compostos voláteis característicos do aroma em
mamões (*Carica papaya* L. cv 'Golden') tratados com metil
jasmonato e armazenados a baixa temperatura / Deborah Oliveira
De Fusco. -- São Paulo, 2015.
59p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental.

Orientador: Purgatto, Eduardo

1. Bromatologia 2. Frutas : Pós-colheita : Agricultura I. T. II.
Purgatto, Eduardo, orientador.

641 CDD

*“It is the very essence of the human mind
to inquire after the causes of whatever
happens in this world of ours”.*

Charles Darwin

*Aos meus pais, Cida e Sergio
e minha irmã Thais*

Agradecimentos

Ao meu orientador Eduardo Purgatto pela orientação, dedicação e motivação desde o início do projeto;

À Fapesp, pela concessão da bolsa de mestrado (2012/12649);

À UGBP (*Union of Growers of Brazilian Papaya*), em especial ao Sr. Rodrigo Martins, Solange e César por nos fornecerem os frutos utilizados neste trabalho;

À Maria Aparecida O. De Fusco pelo incentivo, motivação e principalmente apoio operacional para execução deste trabalho;

Ao Fernando Parra pelo incentivo e por compartilhar de todos os momentos de minha pós-graduação;

Aos colegas Laís Moro, Vanessa Bonato, Caroline de Aquino, Lorenzo Saraiva, Bruna Lima, Helena Chiebao, Victor Alves, Juliana Nunes, Afonso Maia, Marcelo e Ana Sansone, Luciane Lira, Ana Marla Duarte, Talita Pimenta, Florence Castelan, Renata Shitakubo, Vanessa Moreira, Paulo Melfi, Manuela Brito, Sabrina Broetto, Gabriela Schmitz, Maria Fernanda Calháu e Roberto Yamamoto pelo apoio no laboratório e por terem compartilhado suas experiências;

Ao João Emmanuel Guimarães, Gustavo Campanelli e Jurandi Oliveira por compartilharem de seus conhecimentos e suas experiências em Pós-Colheita;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e principalmente aos professores e funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental e do Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos por viabilizarem a execução deste projeto;

Ao Prof. Dr. Angelo Jacomino pelas informações e dúvidas solucionadas no contexto de pós-colheita de mamões;

Aos membros da banca julgadora pelas considerações e revisão do conteúdo desta dissertação;

À todos que colaboraram direta ou indiretamente para que este trabalho pudesse ser executado.

Muito Obrigada!

RESUMO

DE FUSCO, D.O. **Produção de Compostos Voláteis Característicos do Aroma em Mamões** (*Carica papaya* L. cv 'Golden') **Tratados com Metil Jasmonato e Armazenados a Baixa Temperatura**. 2015. 59p. Dissertação de mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos – Área de Bromatologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores mundiais de mamão, fruto apreciado em todo o mundo pelo sabor e polpa delicada. Os compostos voláteis contribuem para a formação do aroma do fruto, o que faz deles essenciais para o desenvolvimento de características sensoriais que definem sua apreciação pelos consumidores. Os principais compostos de aroma do mamão incluem, principalmente, terpenos, ésteres, aldeídos, álcoois, ácidos orgânicos e cetonas, com destaque para o monoterpene linalool que é o composto mais abundante na cultivar 'Golden'. Embora a biossíntese de compostos voláteis seja particularmente afetada pelos tratamentos para conservação pós-colheita, estes são essenciais para a comercialização do mamão, em vista de sua alta perecibilidade. O uso de baixas temperaturas tem sido um dos métodos mais empregados para extensão de vida pós-colheita do mamão. Precedentes da literatura indicam que o tratamento pós-colheita com metil jasmonato (MJ) é capaz de reduzir possíveis efeitos prejudiciais decorrentes do armazenamento a baixa temperatura. Além disso, a aplicação do metil jasmonato em frutos é capaz de estimular a atividade de enzimas das vias de produção de compostos voláteis. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos da aplicação pós-colheita do MJ em mamão (*Carica papaya* L. cv 'Golden'), focando os efeitos sobre as vias de biossíntese de componentes voláteis do aroma, em frutos amadurecidos a temperatura de 22°C, assim como em outros armazenados a 10°C seguido de transferência a 22°C para o pleno amadurecimento. Além dos perfis de compostos voláteis, também foram avaliados os perfis de respiração, produção de etileno, cor da casca, quantificação de MJ e expressão gênica de linalool sintase (LIS). Dada a importância do linalool para o aroma característico do mamão, as variações na transcrição de um gene da linalool sintase foram avaliadas buscando correlacioná-las aos efeitos dos tratamentos na produção dos compostos voláteis. O tratamento com MJ influenciou a produção de compostos voláteis, particularmente de linalool e hexanal nos grupos mantidos a 10°C. Os frutos tratados com o hormônio apresentaram maior abundância do composto quando comparados ao grupo controle. Embora o protocolo de tratamento empregado não tenha conseguido recuperar os altos níveis encontrados nos frutos armazenados a 22°C, não se exclui a possibilidade de que outros desenhos experimentais possam responder de maneira ainda mais satisfatória a este mesmo tratamento.

Palavras-chave: mamão, pós-colheita, voláteis, aroma, metil jasmonato.

ABSTRACT

DE FUSCO, D.O. **Production of volatile representative aroma compounds of papaya (*Carica papaya* cv. 'Golden') treated with methyl jasmonate and stored at low temperature.** 2015. 59p. Dissertação de mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos – Área de Bromatologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

Brazil stands out as one of the world's largest producers of papaya, fruit appreciated worldwide for its taste and delicate pulp. The volatile compounds contribute to the formation of the flavor of the fruit, making them essential for the development of sensory characteristics that define their appreciation by consumers. The main papaya flavor compounds include mainly terpenes, esters, aldehydes, alcohols, organic acids and ketones, especially the monoterpene linalool which is the most abundant compound in the cultivar 'Golden'. Although the biosynthesis of volatile compounds is particularly affected by postharvest treatments for conservation, those are essential for the marketing of papaya, in view of their high perishability. The use of low temperatures has been one of the most used methods for extension of papaya postharvest life. Previous literature indicates that postharvest treatment with methyl jasmonate (MJ) is capable of reducing possible adverse effects arising from storage at low temperature. Furthermore, the application of methyl jasmonate in fruits is able to stimulate the activity of the enzymes of volatile production pathways. Thus, this study aims to evaluate the effects of postharvest application of MJ in papaya (*Carica papaya* L. cv 'Golden'), focusing on the effects in the biosynthetic pathways of volatile aroma compounds in fruit ripened to temperature of 22°C, as well as other stored at 10°C followed by transfer to 22°C for the complete maturation. In addition to the volatile compounds profiles were also evaluated respiration profiles, ethylene production, peel color, quantification of MJ and gene expression of linalool synthase (LIS). Given the importance of linalool to the characteristic aroma papaya, changes in the transcription of a linalool synthase gene were evaluated seeking to correlate them to the treatment effects on the production of volatile compounds. Treatment with MJ influences the production of volatile compounds, particularly linalool and hexanal in the groups kept at 10°C. Fruits treated with the hormone had higher abundance of the compound when compared to the control group. Although the treatment protocol employed has not been able to recover the high levels found in fruits stored at 22°C, do not exclude the possibility that other experimental designs can respond even more satisfactorily to this same treatment.

Keywords: papaya, postharvest, volatile, aroma, methyl jasmonate.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 TRATAMENTO COM METIL JASMONATO	11
3.1.2 Análise da concentração de MJ	12
3.2 RESPIRAÇÃO E PRODUÇÃO DE ETILENO	12
3.3 ANÁLISE DE COR	13
3.4 ANÁLISE DO PERFIL DE COMPOSTOS VOLÁTEIS	13
3.5 QUANTIFICAÇÃO DE METIL JASMONATO	14
3.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE DA LINALOOL SINTASE (LIS) .	15
3.6.1 Extração do RNA total	15
3.6.2 Purificação	16
3.6.3 Quantificação dos ácidos nucleicos	16
3.6.4 Síntese de cDNA	17
3.6.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	17
3.6.6 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 ANÁLISES PARA CARACTERIZAÇÃO DE AMADURECIMENTO.....	21
4.3 ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE AROMA	27
4.5 EXPRESSÃO DO GENE DE LINALOOL SINTASE (LIS)	47
5 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias envolvidas na biossíntese de terpenos. (Esquerda) Via citosólica do mevalonato (MVA). HMGR, 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductase; IDI, isopentenil difosfato isomerase. (Direita) Via plastidial MEP. DXS, 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase; DXR, 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato reductoisomerase; HDS, hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato sintase; IDS, isopentenil difosfato:dimetilalil difosfato sintase; IDI, isopentenil difosfato isomerase; IPP isopentenil difosfato; DMAPP gama, gama-dimetilalila difosfato (Adaptado de Roberts, 2007). 4	
Figura 2. Biossíntese e ação de jasmonatos. Fonte: CREELMAN; MULLET, 1997.	7
Figura 3. Tratamento com MJ 10 ppm pelo método de evaporação. Papel de filtro no interior da caixa contém MJ líquido que volatiliza e atinge a concentração de 10 ppm após 24h.	12
Figura 4. Análise de cor da casca em grupos mantidos a 22°C. O grupo controle 22°C e tratado com 10 ppm de MJ por 24h a 22°C apresentaram um perfil bastante semelhante não sendo possível diferenciar estes dois grupos apenas pela coloração da casca dos frutos. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).	21
Figura 5. Análise de cor da casca em grupos armazenados a 10°C. Nas primeiras 24h, ambos os grupos foram mantidos a 22°C em compartimento fechado com 10 ppm de MJ. Após, os grupos foram armazenados a 10°C até o 10º dia. A partir deste momento, os frutos foram acondicionados a 22°C e repetido o tratamento com MJ nas mesmas condições das primeiras 24h. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).	21
Figura 6. Aspecto da cor da casca em grupos armazenados a 10°C no 10º dia pós-tratamento com MJ 10 ppm. O grupo controle (à esquerda), apresenta cor da casca mais amarelada que o grupo MJ 10°C (direita).	22
Figura 7. Análise de etileno em grupos mantidos a 22°C. Foram avaliados 7 dias pós-tratamento com MJ 10 ppm. O grupo controle obteve um pico climatérico mais pronunciado quando comparado ao grupo tratado com MJ. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).	23
Figura 8. Análise de etileno em grupos mantidos a 10°C. Nas primeiras 24h os frutos foram armazenados a 22°C devido ao tratamento com MJ 10 ppm. Após, permaneceram até o 10º dia a 10°C. Quando foram retirados da baixa temperatura, submetidos novamente ao tratamento com MJ nas mesmas condições do primeiro dia e colocados a 22°C até o pleno amadurecimento. Neste caso, o grupo MJ 10°C obteve um pico climatérico mais pronunciado quando comparado ao controle. Após o 11º dia, também houve aumento na produção de etileno. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).	24
Figura 9. Perfil de respiração em grupos armazenados a 22°C. Observam-se perfis diferenciados entre o grupo controle e tratado com MJ 10 ppm. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).	25
Figura 10. Perfil de respiração em grupos armazenados a 10°C. Quando ainda estavam em tratamento em temperatura de 22°C, o grupo tratado com MJ 10 ppm obteve níveis mais altos de CO ₂ quando comparado ao controle. Já a 10°C, os grupos tiveram perfis semelhantes e quando submetidos novamente ao tratamento com MJ a 22°C após o 10º dia, o grupo MJ 10°C voltou a apresentar níveis superiores de CO ₂ . Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).	26
Figura 11. Análise do nível de MJ no interior da caixa para tratamento dos frutos. Na Figura A observa-se o padrão injetado de um frasco de 100 mL sob as mesmas condições em que a	

caixa permaneceu para tratamento. Já na Figura B observa-se o pico obtido pela injeção do ar no interior da caixa de 56L após 24h.	27
Figura 12. Análise de Componentes Principais obtida pelas áreas normalizadas dos cromatogramas gerados pelo software do CG-MS em grupos armazenados a 10°C controle e MJ 10 ppm (duas aplicações). As duas componentes principais juntas são responsáveis por explicar 51,12% das informações acerca dos voláteis de aroma do mamão 'Golden'.	32
Figura 13. Perfil comparativo de Área Normalizada de Linalool em diferentes dias de tratamento para grupo Controle e MJ 10 ppm na amostragem cujos frutos permaneceram a 22°C. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).	34
Figura 14. Perfil comparativo de Área Normalizada de Linalool em diferentes dias de tratamento para grupo Controle e MJ 10 ppm na amostragem cujos frutos permaneceram a 10°C e que recebeu somente um tratamento com MJ 10 ppm. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).	35
Figura 15. Perfil comparativo de Área Normalizada de Linalool em diferentes dias de tratamento para grupo Controle e MJ 10 ppm na amostragem que recebeu duas aplicações de MJ e armazenamento a 10°C. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).	36
Figura 16. Análise de componentes principais para os compostos voláteis do dia 11 (após a transferência dos frutos de 10°C para 22°C) nos dois experimentos realizados. "C" significa controle e "M" metil jasmonato. A identificação a1 significa que o grupo recebeu somente uma aplicação de MJ, enquanto a2 significa que os grupos receberam duas aplicações de MJ 10 ppm.	38
Figura 17. Análise de componentes principais para os compostos voláteis no dia 15, nos dois experimentos realizados. "C" significa controle e "M" metil jasmonato. A identificação a1 significa que o grupo recebeu somente uma aplicação de MJ, enquanto a2 significa que os grupos receberam duas aplicações de MJ 10 ppm.	40
Figura 18. ACP com frutos maduros provenientes do experimento a 22°C, 10°C (uma aplicação de MJ) e 10°C (2 aplicações de MJ). Avaliação de compostos de aroma comuns aos três experimentos. "C" significa controle e "M" metil jasmonato. A identificação a1 significa que o grupo recebeu somente uma aplicação de MJ, enquanto a2 significa que os grupos receberam duas aplicações de MJ 10 ppm.	42
Figura 19. Perfil comparativo de Área Normalizada de Hexanal em diferentes dias de tratamento para grupo Controle e MJ 10 ppm na amostragem cujos frutos permaneceram a 22°C. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).	43
Figura 20. Perfil comparativo de Área Normalizada de hexanal em diferentes dias de tratamento para grupo Controle e MJ 10 ppm na amostragem cujos frutos permaneceram a 10°C com uma aplicação de MJ 10 ppm. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).	44
Figura 21. Perfil comparativo de Área Normalizada de hexanal em diferentes dias de tratamento para grupo Controle e MJ 10 ppm na amostragem cujos frutos permaneceram a 10°C com duas aplicações de MJ 10 ppm. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).	45
Figura 22. Quantificação de MJ em grupos de mamões armazenados a 22°C. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).	46
Figura 23. Quantificação de MJ em grupos armazenados a 10°C. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).	47

Figura 24. Expressão relativa de LIS, utilizando β -actina como gene normalizador. Foram avaliados os 4 grupos em sete pontos que correspondem aos dias após o tratamento com MJ. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).	47
Figura 25. Expressão Relativa de LIS utilizando TEF como gene normalizador. Foram avaliados os 4 grupos em sete pontos que correspondem aos dias após o tratamento com MJ. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Compostos voláteis tipicamente encontrados no mamão.	3
TABELA 2. Sequência dos oligonucleotídeos específicos para a suposta sequência codificadora de LIS identificada no mamão.	17
TABELA 3. Sequência dos iniciadores para qPCR	18
TABELA 4. Compostos voláteis e suas respectivas descrições de notas de aroma.	28
TABELA 5. Comparação entre compostos voláteis de grupos que receberam uma e duas aplicações de MJ e armazenamento a 10°C.	29

ABREVIATURAS

SAM: S-adenosilmetionina

ACC: 1-aminociclopropano1-carboxílico

ACS: ACC sintase

ACO: ACC oxidase

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nation*

MVA: mevalonato

IPP: isopentenil difosfato

DMAPP: gama-dimetilalil difosfato

GPP: difosfato de geranil

LOX: lipoxigenase

HPL: hidroperóxido liase

ADH: álcool desidrogenase

AAT: álcool acil transferases

MJ: metil jasmonato

ABA: ácido abscísico

AS: ácido salicílico

AJ: ácido jasmônico

FDA: *Food and Drug Administration*

GRAS: *Generally Recognized as Safe*

POD: peroxidase

U.R: Umidade Relativa

SPME: Micro-extração em fase sólida

PCR: Reação em cadeia da polimerase

LIS: linalool sintase

NTC: *No template control*

qPCR: PCR quantitativo

ERF1: Fator de resposta de etileno

ACP: Análise de componentes principais

1 INTRODUÇÃO

Em frutos climatéricos, após a colheita, observa-se aumento na atividade respiratória, precedido pelo incremento na liberação do etileno (TAIZ; ZEIGER, 2004). Apesar da função fisiológica do aumento respiratório ainda ser pouco claro, o papel do etileno e os mecanismos moleculares de sua ação nos frutos foram mais detalhados nas últimas duas décadas, embora muitas questões ainda estejam em aberto. O etileno é formado a partir do aminoácido metionina via S-adenosilmetionina (SAM) e seu precursor imediato, o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). SAM é sintetizada a partir da metionina por ação da SAM sintase e a conversão de SAM em ACC é catalisada pela ACC sintase (ACS) (KENDE, 1993). ACC é metabolizada pela ACC oxidase (ACO) por uma reação de oxidação que depende de O₂ para produzir etileno. No ciclo de Yang, a metionina é recuperada para ressintetizar a SAM. Em alguns casos, o etileno regula sua própria produção induzindo a nova síntese de ACS e ACO (GRIERSON, 1998). Nos tecidos o etileno se difunde tanto no meio lipídico (membranas) como aquoso e se liga aos seus receptores associados predominantemente à membrana do retículo endoplasmático, desencadeando as alterações fisiológicas que culminam com o amadurecimento e senescência do fruto (LELIÉVRE et al., 1997). Muitos genes associados ao amadurecimento são tidos como regulados pelo etileno, dentre os quais vários que codificam enzimas implicadas nas mudanças de cor, firmeza do fruto, defesa contra patógenos e composição nutricional (ABELES; MORGAN; SALTVEIT, 1992). O bloqueio na síntese ou ação do etileno após a colheita inibe a expressão destes genes etileno-dependentes e, em consequência, afeta diversos processos relacionados ao amadurecimento dos frutos.

As exportações brasileiras de mamão cresceram 17,9% em 2014. As vendas do fruto para o mercado externo totalizaram 33.688 toneladas, sendo que em 2013 foram 28.561 toneladas. O maior exportador do fruto continua sendo o Espírito Santo, seguido dos estados do Rio Grande do Norte e Bahia (BRAPEX, 2015).

Europa e Estados Unidos são os maiores mercados consumidores do mamão exportado pelo Brasil. Boa parte da via de transporte utilizada para a

exportação é aérea, apesar de ser mais dispendiosa. Assim, a cadeia de frio é de suma importância para a extensão da vida de prateleira, por se tratar de um fruto bastante perecível cujas perdas podem chegar a 46% em países em desenvolvimento (SIVAKUMAR; WALL, 2013). A exportação via marítima reduz os custos com o transporte, porém exige maior tempo de conservação dos frutos, sendo necessário armazenamento a baixa temperatura por um período, em média, de 20 dias. Temperaturas em torno de 10°C são geralmente as mais utilizadas para a conservação do mamão, e sua efetividade depende de fatores como estágio de maturação, tipo de cultivar e condições ambientais de produção (CHEN; PAULL, 1986; SIVAKUMAR; WALL, 2013). Apesar dos ganhos na extensão da vida útil do fruto, a cadeia de frio também traz prejuízos para a qualidade por levar a redução na emissão de componentes voláteis do aroma.

Os principais compostos de aroma no mamão (TABELA 1) incluem terpenos, ésteres, aldeídos, álcoois, ácidos orgânicos e cetonas (FUGGATE et al., 2010). O monoterpreno linalool é o mais abundante (FLATH; FORREY, 1977), sendo que na variedade do grupo Solo, este composto constitui 94% do total dos compostos voláteis (FRANCO; RODRIGUES-AMAYA, 1993). Dezenas de outros compostos estão presentes em pequenas quantidades, mas isto não significa que contribuam pouco para o aroma característico do fruto, pois o poder odorífero varia para cada substância. Assim, compostos presentes em pequenas concentrações podem render características marcantes e diferenciadas ao aroma do fruto.

TABELA 1. Compostos voláteis tipicamente encontrados no mamão.

Grupo	Tipo de Composto
Ésteres	Metil butanoato, etil hexanoato, etil dodecanoato, etil acetato, etil butirato, prop-2-il butirato, metil hexanoato, metil octanoato, etil benzoato, butil hexanoato, etil octanoato, Butil benzoato, 3-metilbutil benzoato, etil butanoato.
Álcoois	Butanol, Benzil álcool, terpinen-4-ol, α -terpineol.
Terpenos	Mirceno, α -felandreno, α -terpineno, β -felandreno, limoneno, (trans)- β -ocimeno, (cis)- β -ocimeno, γ -terpineno, terpinoleno, cariofileno, (trans)-óxido de linalool, (cis)-óxido de linalool, linalool.
Aldeídos	Hexanal, Heptanal, benzaldeído, octanal, nonanal, decanal.
Lactonas	γ -Hexalactona, γ -Octalactona.
Outros	Benzil isotiocianato, ácido dodecanóico, metil salicilato, triacetina, metil geranato, benzil isotiocianato, metil tiocianato, fenilacetoneitrila, germacreno D, pentadecano, geranilacetona, pentano-2,4-diona, 6-metilhept-5-en-2-ona, heptan-2-ona, 4-hidroxi-4-metilpentan-2-ona.

Fonte: Almora et al (2004); Pino et al (2003); Flath et al (1990).

Já foram detectados mais de 300 compostos voláteis de aroma em diferentes cultivares de mamões. Na cultivar *Maradol*, o metil butanoato é o mais abundante (16,2% do total de voláteis), enquanto no grupo *Solo* o linalool é o majoritário (68%) (PINO, ALMORA, MARBOT; 2003). Isso demonstra que os componentes voláteis podem ser cultivar dependentes, além de sofrerem influência geográfica e até mesmo época do ano em que os frutos são produzidos. No Brasil, a cultivar *Golden* do grupo *Solo* é a mais exportada (JACOMINO, BRON, KLUGE; 2003) e o principal composto identificado no aroma desta variedade é o monoterpeno linalool ($C_{10}H_{18}O$).

Há duas vias envolvidas na biossíntese dos terpenos: uma via citosólica ou rota do mevalonato (MVA) e outra proveniente dos plastídeos ou rota da 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) (Figura 1).

Ambas as vias conduzem à produção de isômeros do isopreno, o isopentenil difosfato (IPP) e/ou o de gama-dimetilalil difosfato (DMAPP), que constituem os monômeros a partir dos quais vão se originar os diferentes terpenos. A partir da condensação de uma molécula de IPP com DMAPP forma-se o difosfato de geranil (GPP), precursor dos monoterpenos (BARROS; et al, 2009).

Figura 1. Vias envolvidas na biossíntese de terpenos. (Esquerda) Via citosólica do mevalonato (MVA). HMGR, 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductase; IDI, isopentenil difosfato isomerase. (Direita) Via plastidial MEP. DXS, 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase; DXR, 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato reductoisomerase; HDS, hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato sintase; IDS, isopentenil difosfato:dimetilalil difosfato sintase; IDI, isopentenil difosfato isomerase; IPP isopentenil difosfato; DMAPP gama, gama-dimetilalila difosfato (Adaptado de Roberts, 2007).

A biossíntese dos monoterpenos tem início com a ionização do difosfato de geranyl (GPP). A desprotonação do C₄ do cátion linalílico, resultante desta ionização, leva à obtenção do cis-β-ocimeno. Sua hidratação, por sua vez, dá origem ao linalool. Uma proposta para a biossíntese do óxido de linalool consiste na hidroxilação do linalool pela ação das enzimas do citocromo P₄₅₀ via intermediário 6,7-epóxido de linalool. Além desta, foi demonstrado que a auto-oxidação do linalool, pela sua exposição ao oxigênio presente no ar, também conduz a formação do óxido de linalool (BARROS; et al, 2009).

Muitos terpenos não são voláteis e estão envolvidos em processos importantes do desenvolvimento e manutenção da estrutura celular vegetal, como formação de membranas, fotossíntese, reações de oxi-redução e controle de crescimento. Os terpenos voláteis como hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅) e alguns diterpenos (C₂₀) estão relacionados a polinização e respostas ao estresse (DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON, 2004). Apesar da diversidade, todos os

terpenos derivam de unidades comuns de isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP) (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

De modo geral, a via citosólica é responsável pela síntese de sesquiterpenos, fitoesteróis e ubiquinona, enquanto, monoterpenos, giberelinas, ácido abscísico, carotenoides, a porção prenil de clorofilas, plastoquinonas e tocoferol são produzidos nos plastídeos (ROHMER, 2003).

Compostos voláteis também podem ser formados a partir de lipídeos por vias diferentes. A via primária inclui α e β oxidação, via enzimas da família das lipoxigenases. Muitos dos ésteres alifáticos, álcoois, ácidos e carbonilas encontradas em frutos são derivados da degradação oxidativa dos ácidos linoleico e linolênico (ROWAN; et al, 1999). Os ácidos hidroperoxilinolênicos, resultantes deste processo, passam por clivagem pela hidroperóxido liase resultando em vários produtos que incluem o hexanal, o 3-cis-hexenal e ω -ceto ácidos, como o ácido 12-ceto-cis-9-dodecenóico. Vários outros isômeros do hexanal e hexenal são encontrados em frutos, principalmente quando estes se encontram no estágio verde pré-climatérico.

Os ácidos graxos de cadeia curta podem alimentar a via catabólica (β -oxidação) que resulta na formação de acil CoA de cadeia curta que vão desde acetil CoA a dodecanoil CoA. Os acil CoA de cadeia curta e álcoois (etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, etc.) são esterificados para formar uma variedade de ésteres que constituem componentes de aroma de vários frutos, incluindo o mamão (PALIYATH; et al, 2008).

Também contribuem para a composição do aroma de frutos, o grupo dos aldeídos e álcoois saturados e insaturados C_6 e C_9 . Estes possuem cadeia curta e são produzidos também em resposta a injúria, com função importante na estratégia de defesa das plantas. Pelo menos quatro enzimas estão envolvidas na biossíntese destes compostos: lipoxigenase (LOX), hidroperóxido liase (HPL), 3-trans, 2-cis-enal isomerase e álcool desidrogenase (ADH), sendo os genes desta última enzima, que participa da produção de aromas, expressos particularmente durante o amadurecimento dos frutos (MATSUI; 2006). Apesar da constatação de que o etileno realmente influencia as vias de biossíntese de compostos de aroma, pouco é conhecido sobre os mecanismos moleculares que regulam a relação entre a biossíntese de etileno e a biossíntese de ésteres voláteis. Algumas isoformas de lipoxigenases (LOX),

álcool desidrogenases (ADH) e álcool acil transferases (AAT) são induzidas ou expressas constitutivamente durante o período climatérico, após o aumento da produção de etileno (DIXON; HEWETT, 1992). A associação entre etileno e produção de aroma pôde ser demonstrada através da inibição da ação desse hormônio e de sua biossíntese (via tratamento com 1-metilciclopropeno), que resultou em uma redução nos níveis de ésteres voláteis em maçãs (LURIE; et al, 2002).

Fitohormônios e voláteis de aroma

Outros hormônios detectados em frutos, como metil jasmonato (MJ), ácido abscísico (ABA) e ácido salicílico (AS), podem agir isoladamente ou associados controlando os efeitos uns dos outros (SOARES; MACHADO, 2007). A sinalização de cada um ainda não é bem compreendida, no entanto, resultados de literatura indicam que as etapas envolvidas não seguem uma via única e sim bifurcações nas cascatas que levam à diversos tipos de respostas. Há várias evidências demonstrando que tais hormônios agem em coordenação com o etileno estimulando não só mecanismos de defesa, como também as vias de produção de compostos voláteis de aroma (KONDO; et al, 2005).

Derivado da oxidação de ácidos graxos lipoxigenase-dependente, o ácido jasmônico (AJ) e seu derivado MJ modulam a expressão de muitos genes e influenciam aspectos específicos do ciclo de vida das plantas como crescimento, desenvolvimento e respostas ao estresse abiótico e biótico (LEE; KADER, 2000). Jasmonatos podem ser detectados durante o período de formação de flores, frutos e sementes em níveis relativamente elevados em plantas em desenvolvimento e tecidos reprodutivos. Durante um processo de estresse, ocorrem danos físicos às células vegetais, o que desencadeia a degradação sequencial de lipídeos que pode ser iniciado pelas lipoxigenases. Estas formam hidroperóxidos de ácidos graxos, que são rapidamente metabolizados para formar vários produtos. Dentre estes está o ácido jasmônico (Figura 2), que está associado à ativação de genes que codificam a síntese de proteínas de reserva e inibidores de proteases (MELAN; et al, 1993).

Figura 2. Biossíntese e ação de jasmonatos. Fonte: CREELMAN; MULLET, 1997.

Sinais como elicitores interagem com a membrana do receptor, o que causa a produção de ácido 13-hidroperoxilínolênico que ocorre com a liberação do ácido linolênico também via fosfolipase ou lipase seguida pela oxidação pela lipoxigenase (LOX). Ácido 13-hidroperoxilínolênico pode então ser catabolizado pela hidroperoxiliase (HPL), formando aldeídos voláteis ou ácido traumático, ou via peroxidase formando monômeros de cutina. O ácido jasmônico deriva do ácido 13-hidroperoxilínolênico via aleno-óxido sintase (AOS) e de uma via aleno-óxido ciclase (AOC) dependente com ácido 12-oxo-fitodienóico (12-oxo-PDA) como um intermediário. O ácido jasmônico age então como modulador de gene de expressão ou pode ser catabolizado e dar origem ao metil jasmonato.

Os jasmonatos vem sendo largamente estudados quanto ao seu envolvimento em processos de defesa nos tecidos vegetais. Contudo, um novo campo vem se abrindo em relação ao seu uso pós-colheita em frutos, com destaque para o MJ, classificado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) como substância “*Generally Recognized as Safe* (GRAS)”. Aplicações exógenas de MJ já demonstraram o potencial deste hormônio para manter a qualidade de frutos retardando a senescência, prevenindo a injúria pelo frio e aumentando a atividade antioxidante (WANG; et al, 2009, JIN; et al, 2009).

Moreno et al. (2009) observaram em pesquisas realizadas com morangos que a maior parte dos compostos de aroma tiveram suas concentrações aumentadas quando o fruto foi tratado com MJ. O composto 1-octanol teve aumento significativo durante todo o período de armazenamento,

enquanto 1-hexanol e linalool tiveram aumento significativo somente após o tratamento por cinco dias, diminuindo em seguida. A diminuição foi apontada como decorrente do aumento da atividade de uma isoforma de AAT em consequência do tratamento com MJ. Em relação aos etil ésteres, a concentração de etil hexanoato aumentou significativamente nas amostras tratadas por cinco dias. De fato, este composto foi o mais afetado pelo tratamento com MJ. No entanto, este efeito não foi observado nas amostras tratadas com o hormônio por um tempo mais longo. Em geral, a aplicação de vapor de MJ em morangos afetou significativamente a composição da fração volátil, aumentando a produção dos compostos de aroma mais relevantes (MORENO; et al, 2009).

O tratamento com MJ aumentou a atividade de LOX que é considerada uma das enzimas-chave na produção de compostos voláteis em frutos (GONZÁLEZ-AGUILAR; et al, 2004). Alguns trabalhos tem demonstrado que a aplicação exógena de jasmonatos em frutos e hortaliças também aumenta a atividade antioxidante além da formação de compostos voláteis (MORENO; et al, 2009).

Alguns dos trabalhos publicados até o momento abordaram o tratamento com derivados do ácido jasmônico na redução de deterioração e desenvolvimento de injúria pelo frio em manga (GONZÁLEZ-AGUILAR; et al, 2000), goiaba (GONZÁLEZ-AGUILAR; et al, 2004), tomate (DING; et al, 2001), abacate, *grapefruit* (MEIR; et al, 1996), mamão (WANG; BUTA, 1994), romã (SAYYARI; et al, 2010) pêssego, entre outros. O tratamento com MJ reduziu o teor de compostos fenólicos e aumentou a atividade da peroxidase (POD), resultando em redução na injúria pelo frio. O MJ pode estar relacionado ao mecanismo de regulação da degradação da parede celular e do teor de cálcio na parede celular da polpa, o que seria benéfico para manter a qualidade de pêssegos (JIN; et al, 2009). A indução da tolerância ao frio pelo MJ também foi associada ao aumento de poliaminas e níveis de ácido abscísico que estão relacionados à ativação dos mecanismos de defesa dos tecidos (WANG; BUTA, 1994).

A aplicação do MJ foi relatada em mamões da cultivar *Sunrise*. O tratamento com vapor de MJ por 16h a 20°C inibiu a degradação por fungos, bem como a injúria pelo frio e perda de firmeza do fruto (GONZÁLEZ-

AGUILAR; BUTA; WANG, 2003). Outro trabalho teve por objetivo abordar o mecanismo de defesa e indução de genes relacionados a estes processos no mamão da cultivar *Maradol*, após estes serem submetidos ao tratamento com MJ e a baixas temperaturas (RIVERA-DOMINGUEZ et al, 2012). Embora estes trabalhos tenham abordado os efeitos do MJ, não há relatos na literatura que descrevam os efeitos do hormônio sobre biossíntese de compostos voláteis em frutos de mamoeiro.

Os exemplos acima demonstram o potencial do MJ como um indutor de vias metabólicas associadas a produção de compostos voláteis. No entanto os mecanismos moleculares envolvidos e os pontos específicos afetados nas diversas vias metabólicas que compõem o aroma de frutos e, em particular no mamão ainda são pouco conhecidos.

2 OBJETIVO

Determinar os efeitos da aplicação pós-colheita do metil jasmonato em mamões (*Carica papaya* L. cv. 'Golden'), focando os efeitos sobre a síntese de compostos voláteis do aroma do fruto, durante o amadurecimento regular e também após o armazenamento a baixa temperatura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidos 180 mamões (*Carica papaya* cv. 'Golden') provenientes do município de Linhares-ES, junto à empresa UGBP (*Union of Growers of Brazilian Papaya*), nos meses de fevereiro e abril de 2014. Os frutos foram transportados até o laboratório sob refrigeração e chegaram em estágio 1 de maturação na qual a cor amarela não cobre mais de 15% da superfície da casca e o restante apresenta-se com coloração verde-claro. Os mamões foram submetidos às práticas comerciais da região e tratamento térmico 47°C/20 min seguido de resfriamento a 14°C/17 min. Ao chegar ao laboratório, os frutos foram lavados com água corrente, mantidos por 1 minuto em solução de hipoclorito de sódio a 0,1% (v/v) para redução da carga microbiana superficial, lavados novamente com água e secos.

3.1 TRATAMENTO COM METIL JASMONATO

Para o experimento acerca dos efeitos do MJ sobre a produção de voláteis e expressão de enzimas ligadas às vias de produção de aromas, os frutos foram divididos em quatro grupos:

- *Grupo Controle*: armazenado a 22°C $\pm$ 1°C, 80% $\pm$ 5% U.R até o amadurecimento completo (casca totalmente amarela e polpa alaranjada).

- *Grupo MJ*: tratados com MJ 10 ppm, por 24h em recipiente fechado e mantidos a 22°C $\pm$ 1°C, 80% $\pm$ 5% U.R até o pleno amadurecimento, conforme ilustrado na Figura 3.

- *Grupo frio*: Frutos armazenados a 10°C $\pm$ 1°C, 80% $\pm$ 5% U.R por 10 dias e, em seguida, colocados a 22°C $\pm$ 1°C, 80% $\pm$ 5% U.R por mais 5 dias para o pleno amadurecimento.

- *Grupo MJ + frio*: Frutos previamente tratados com MJ (24h em recipiente fechado para atingir a concentração de 10 ppm de MJ) e armazenados em seguida, a 10°C $\pm$ 1°C, 80% $\pm$ 5% U.R por 10 dias. Após este período os frutos foram transferidos para câmara a 22°C $\pm$ 1°C, 80% $\pm$ 5% U.R por mais 5 dias até o amadurecimento pleno. O tratamento foi realizado somente uma vez, no dia 0 para o grupo denominado "A1". Para o grupo denominado "A2", houve duas aplicações de MJ, nos dias 0 e 10. Em ambos os grupos com uma ou duas aplicações de MJ, o tratamento foi realizado a 22°C,

utilizando o MJ na forma líquida que volatiliza espontaneamente a temperatura ambiente e atinge ao final das 24h a concentração de 10 ppm no interior da caixa fechada, conforme a Figura 3.

Figura 3. Tratamento com MJ 10 ppm pelo método de evaporação. Papel de filtro no interior da caixa contém MJ líquido que volatiliza e atinge a concentração de 10 ppm após 24h.

3.1.2 Análise da concentração de MJ

Para a verificação da concentração de MJ retirou-se após 24h, 1mL de ar do interior da caixa com auxílio de uma seringa e em seguida, injetou-se em CG (FID). As condições cromatográficas foram: injeção com divisor de amostra (*split*), em taxa de 50:1 e temperatura de 200°C; volume de injeção 1 mL; corrida inicial a 60°C por 1 min e rampa de 25°C/min a 280°C por 9 min, totalizando 18,80 min de corrida. Empregou-se hélio como gás carreador em fluxo constante de 1,0 mL/min; temperatura do detector de 250°C. A coluna utilizada foi Agilent 19091J-413 HP-5% *Phenyl Methyl Siloxane* (30 m X 320 μ m X 0,25 μ m). Para referência, utilizou-se um frasco de 100 mL com papel de filtro no qual foi pipetado 1 μ L de MJ. O hormônio foi deixado para evaporar a temperatura ambiente, obtendo, assim uma concentração de 10 ppm. As áreas dos picos em ambas análises foram comparadas para avaliar se a concentração de MJ usada nos tratamentos estava próxima a desejada.

3.2 RESPIRAÇÃO E PRODUÇÃO DE ETILENO

A estimativa de CO₂ foi realizada pela injeção de amostras de ar do interior de jarros de 3L contendo 2 mamões (4 jarros para cada grupo acima descrito) em um cromatógrafo a gás da Hewlett-Packard modelo GC-6890 equipado com detector de condutividade térmica. A coluna utilizada foi a HP-Plot Q (30 m, D.I. 0,53 mm). As condições cromatográficas foram: injeção com divisor de amostra (*split*) em taxa de 50:1 e temperatura de 250°C; volume de

injeção 1mL; corrida isotérmica a 30°C empregando hélio como gás carreador em fluxo constante de 4mL/min; temperatura do detector em 250°C utilizando como referência fluxo de hélio a 7mL/min. A estimativa da quantidade de CO₂ foi feita em relação a injeção de 1 mL de padrão de CO₂ 326 µL/L em ar sintético da *Air Liquid*.

Na análise de etileno, foi empregado o mesmo equipamento e a mesma coluna cromatográfica, porém com detecção por ionização de chama. O volume de injeção foi de 10 mL e para injetar tal quantidade de ar, foi empregado o modo de injeção *pulsed splitless*, desenvolvido pela Hewlett-Packard, opcional das válvulas de injeção com EPC utilizadas nos modelos de cromatógrafo a gás desta empresa. As condições de injeção foram: pressão de 20 psi por 2 minutos, fluxo de ventilação de 5 mL/min após 30 segundos de injeção e temperatura do injetor em 200°C. As demais condições cromatográficas empregadas foram: corrida isotérmica a 30°C empregando hélio como gás carregador em fluxo constante de 1 mL/min; temperatura do detector em 250°C, fluxo de ar e hidrogênio no detector em 450 mL/min e 50 mL/min, respectivamente. A estimativa da quantidade de etileno produzida pelos frutos foi feita em relação à injeção de um padrão de 0,1 µL/L de etileno em ar sintético da *Air Liquid*.

3.3 ANÁLISE DE COR

O método utilizado foi o descrito por FABI et al. (2007) utilizando um colorímetro HunterLab ColorQuest XE[®] (Hunter Associates Laboratories). A cor é expressa em relação ao valor de matiz (Hue) calculado pela fórmula:

$$H = \tan^{-1}(b/a),$$

Onde b (quantidade de amarelo e azul) e a (quantidade entre vermelho e verde) são valores fornecidos pelo aparelho, levando em conta o plano de cores descrito pelo método Hunter.

3.4 ANÁLISE DO PERFIL DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

Foram realizadas análises ao longo do amadurecimento utilizando o método de micro-extração em fase sólida (SPME). Para os grupos

armazenados a 22°C foram avaliados os dias 0, 1, 3, 5 e 7. Já para os grupos armazenados a 10°C foram avaliados os dias 0,1,3,5,7,10,11,13 e 15.

O método de extração de voláteis por SPME empregou uma resina de carboxeno, divinilbenzeno e polidimetilsiloxano de 100µm de espessura da Supelco® (CAR/DVB/PDMS).

Aproximadamente 4g de polpa de um *pool* de três frutos foram acrescidos de 2 mL de solução de NaCl a 30% (p/v). Durante o procedimento, os pequenos cilindros de polpa foram acondicionados em béquer com gelo para preservar os voláteis de aroma. Em seguida, foram colocados em *vial* dotado de tampa com septo de silicone e congelados a temperatura de -20°C para posterior análise por CG-MS. No momento da análise, a polpa foi descongelada a 40°C, em banho-maria com agitação intensa. Os voláteis de aroma foram acumulados por 20 minutos e a fibra para SPME foi introduzida no *vial* e exposta ao ar do interior do frasco por mais 40 minutos. Uma vez capturada, a amostra foi dessorvida da fibra pela exposição ao calor do injetor do cromatógrafo (200°C) por 3 minutos. Foi utilizado o cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 6890 acoplado a um detector seletivo de massas da mesma empresa modelo 5973. A coluna cromatográfica empregada foi a Supelcowax 10 (tamanho 30 m, 0,25 mm de diam. Interno, 0,25 µm de espessura do filme). O programa de temperatura utilizado foi: 35°C por 0,5 minutos, rampa de temperatura de 5°C/min até 250°C, permanecendo por 1 minuto, seguida de nova rampa a 20°C/min até 310°C e permanecendo por 2 minutos. A temperatura da interface entre o cromatógrafo e o detector seletivo de massas foi de 230°C e a ionização foi feita por impacto de elétrons (70 eV) com a fonte de íons mantida a 150°C.

As análises foram realizadas em duplicata para cada uma das amostras. Os espectros de massas obtidos foram comparados com os da biblioteca NIST versão 1.6 e considerado com identificação positiva aqueles com índice de similaridade acima de 70%.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE METIL JASMONATO

Foram analisadas amostras de polpa dos dias 0,1,3,5, e 7 em grupos mantidos a 22°C. Já para os grupos a 10°C, foram analisadas amostras dos dias 0,1,3,5,7,11,12,13 e 15. As extrações do hormônio em ambos os grupos

foram realizadas em triplicata para cada dia. Foi utilizada 0,5g de polpa congelada e triturada na qual foi adicionada 2,5 mL de acetonitrila a temperatura ambiente. Adicionou-se 0,880g de padrão interno metil heptanoato (MH) e a mistura foi agitada em vórtex por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12000 x *g* por 5 minutos. Coletou-se o sobrenadante e o procedimento foi repetido com o resíduo por três vezes. Nas repetições, foram adicionados 0,5 mL de acetonitrila, agitação em vortex por 2 minutos e centrifugação por 5 minutos. Desta forma, o sobrenadante foi combinado e seco em fluxo de N₂ para que a acetonitrila evaporasse. O resíduo foi ressuscitado com 60 µL de acetonitrila e centrifugado novamente a 12000 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrífuga, o qual foi novamente centrifugado para evitar a presença de qualquer resíduo. Foram coletados 50 µL de sobrenadante que foi transferido para um frasco de 2,0 mL contendo um inserto de 200 µL. Foi utilizado o cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 6890 acoplado a um detector seletivo de massas da mesma empresa modelo 5973, utilizando-se o modo de monitoramento seletivo de íons. A coluna empregada foi a Agilent 19091S-433 HP – 5MS – 5% *Phenyl Methyl Siloxane* (30 m X 250 µm X 0,25 µm). Foi utilizado o modo *splitless* e hélio como gás carreador. A temperatura inicial foi de 60°C por 1 min com rampa de 15°C/min a 270°C por 9 min, totalizando uma corrida de 24 min (Adaptado de XIONG et al, 2012).

3.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE DA LINALOOL SINTASE (LIS)

3.6.1 Extração do RNA total

Para a extração de RNA total da polpa do fruto foram utilizadas amostras congeladas e armazenadas a -80°C. Foram selecionados 5 pontos dos grupos mantidos a 22°C, referentes aos dias pós-tratamento 0,1,3,5 e 7. Para os grupos mantidos a 10°C foram selecionados os dias 0,1,3,5,7, 11 e 13. Para todas as amostras as extrações foram executadas em triplicata.

Foram utilizadas 80 mg de polpa pulverizada em N₂ líquido nas quais foi adicionado 500 µL de *Concert™ Plant RNA Reagent* gelado (*Life Technologies™*), que auxilia o rompimento da parede celular do fruto e das membranas, liberando seu material nucleico. A mistura foi homogeneizada e

mantida a temperatura ambiente por 5 min e centrifugada a 12000 x *g* a temperatura de 20°C. O sobrenadante foi coletado em um novo tubo de microcentrífuga. Adicionou-se 100 µL de solução de NaCl 5 M, que auxilia na precipitação das proteínas ligadas ao material nucléico e então homogeneizou-se por inversão. Foram adicionados 300 µL de clorofórmio, que auxilia a desnaturação de proteínas, que possivelmente ainda estejam ligadas ao material nucleico, e homogeneizou-se novamente. As amostras foram centrifugadas a 12000 x *g* por 10 min a 4°C. A fase aquosa foi recolhida em um novo tubo de microcentrífuga ao qual foi adicionado 500 µL de álcool isopropílico, que precipita o material nucleico. Homogeneizou-se por inversão e centrifugou-se a 12000 x *g* por 10 min a 4°C. O precipitado foi lavado por 3 vezes com 1 mL de álcool etílico 80% e a amostra centrifugada por 12000 x *g* por 1 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado a cada repetição da lavagem. Após a secagem completa do álcool etílico 80% da amostra, ressuspendeu-se o precipitado com 30 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) que foi mantido em gelo por cerca de 1h para completa dissolução do RNA.

O material extraído foi quantificado por espectrofotometria (**item 3.6.3**) e a qualidade do RNA total foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v) corado com *GelRed™* em diluição 1:500 (v/v) e visualizado no transiluminador sob luz ultravioleta.

3.6.2 Purificação

As amostras foram tratadas com DNase seguindo as instruções do kit Ambion® *DNA-free™ DNase Treatment & Removal Reagents (Life Technologies™)*. Também foi avaliada a integridade do RNA após essa etapa, pelo método descrito no item 3.6.1. (GOMES, 2012).

3.6.3 Quantificação dos ácidos nucleicos

A quantidade de RNA foi calculada por espectrofotometria (SAMBROOK et al., 1989) considerando que uma amostra que contém 40 µg/mL de RNA apresenta valor de absorbância igual a 1,0 a 260 nm. Somente amostras de RNA total com razões A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,0 foram utilizadas para síntese do DNA complementar (cDNA) (GOMES, 2012).

3.6.4 Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA utilizado nas reações de PCR quantitativa, o protocolo utilizado foi o descrito no kit *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega™), baseado na utilização de uma transcriptase reversa e de Oligo(dT)15 como *primer* para a síntese do cDNA a partir do RNA total. Para o início da reação, partiu-se de 400 ng de RNA total quantificado nas amostras (GOMES, 2012).

3.6.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para testar a especificidade dos *primers* desenhados, antes de iniciar as análises de PCR em tempo real, foram feitas amplificações do fragmento por PCR convencional com 35 ciclos, consistindo das seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C/4 min, desnaturação a 94°C/30s, pareamento dos *primers* a 60°C por 30s, extensão a 72°C/1 min e 30s e extensão final a 72°C/4 min. A reação de amplificação consistiu de uma alíquota de 1µL da reação de cDNA, 1µL de solução 10 µM de cada primer, dNTP 2,5µM, MgCl₂ 4 mM e 1 unidade da enzima *Taq polimerase* em um volume total de 20 µL de reação.

Para a confirmação da amplificação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE (tri-acetato-EDTA) (SAMBROOK et al., 1989), contendo *SYBR Safe*. Foi utilizado o marcador de peso molecular 1kb *DNA Ladder* (Invitrogen®) como padrão (GOMES, 2012).

Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do fragmento de LIS no mamão estão descritos a seguir:

TABELA 2. Sequência dos oligonucleotídeos específicos para a suposta sequência codificadora de LIS identificada no mamão.

Gene	Sentido	Sequência
LIS	Forward	5'-CGT TGC TTC ACC CTT CAA AC -3'
	Reverse	5'-GAG GAA TCT GTA TTG AAG AGG C -3'

Fonte: GOMES, 2012.

3.6.6 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

Nesta técnica quantificação é baseada na emissão da fluorescência de acordo com o aumento do número de ciclos de PCR. Para as reações foram utilizados os *primers* específicos para amplificação de trechos das sequências de *LIS*.

Para as reações de PCR em tempo real foi utilizado o kit Power SYBR® Green qPCR (*Life Technologies*™), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. O SYBRGreen® é um fluoróforo que possui a capacidade de se intercalar nos trechos de DNA dupla fita formados na reação.

As reações foram conduzidas em aparelho termociclador modelo 7500 da Applied Biosystems, em triplicata técnica, tanto para o controle negativo quanto para cada amostra analisada. Foram utilizados os genes constitutivos da β -actina e o fator de alongação 1 α (TEF) (TABELA 3) como controle endógeno e normalizador dos cálculos de expressão relativa de *LIS*.

Também foram utilizados um controle negativo NTC (*No Template Control*) contendo todos os reagentes exceto o cDNA, que foi substituído pelo mesmo volume de água DEPC. A partir dos cDNAs provenientes da reação da transcriptase reversa foram utilizados 6,25 μ L nas reações de amplificação, às quais acrescentaram-se 12,5 μ L de *Power SYBR® Green qPCR*, 6,25 μ L de um mix equimolar de cada *primer* para um volume final de 25 μ L (FABI, et al., 2012; GOMES, 2012; BROETTO, 2013).

TABELA 3. Sequência dos iniciadores para qPCR

Gene	Sentido	Sequência
β -actina	Forward	5'-CGT GAC CTT ACT GAT CAC TTG-3'
	Reverse	5'-GTC AAG GGC AAT GTA AGA CAG-3'
TEF	Forward	5'- GTTAAGAACGTTGCCGTGAAG-3'
	Reverse	5'- ATGTGAAGTTGGCTGCTTCCT-3'

Fonte: BROETTO, 2013.

A programação utilizada no termociclador foi de 95°C/5 min para ativação da *Taq* Polimerase, 40 ciclos de 95°C/15s para desnaturação, 60°C/30s para pareamento dos *primers*, 72°C/30s para extensão.

Para a verificação da especificidade da amplificação e confirmação da ausência de formação de dímeros do *primer* ou qualquer outro produto inespecífico, as reações foram finalizadas com a determinação da temperatura da curva de dissociação do produto, que utilizou uma rampa de variação de 72°C a 95°C. A temperatura apresentada na curva de dissociação de cada gene deve ser a mesma para todas as reações, de modo a indicar a pureza do produto gerado.

A eficiência das reações foi calculada a partir das curvas geradas nas reações de calibração de cada gene. Nessas reações foram utilizadas diluições seriadas de 1:100 do material sem diluição (SD) de um *pool* de cDNA de todos os pontos amostrados. A partir do resultado das reações foi traçada uma curva de eficiência levando-se em consideração o logaritmo da quantidade de RNA, referente às diluições do cDNA e o Ct da reação. Foi determinada a equação da reta através de regressão linear, integrando os valores de Ct no eixo das ordenadas e o logaritmo da quantidade de RNA no eixo das abscissas. A fórmula da regressão linear desta reta-padrão ($y = mx + b$) serviu de base para os cálculos posteriores na determinação do R^2 , cujo valor máximo é igual a 1, e da Eficiência (E) da reação, calculada a partir da inclinação da reta (*Slope*) e que é expressa pela equação: $E = 10^{(-1/\text{slope})}$.

A expressão gênica foi determinada pelo cálculo da expressão relativa a partir dos valores de razão determinados para o dia 0 (em que teve início o tratamento dos frutos com MJ e frio) foi adotado como valor de referência para os pontos de análise. Para o cálculo da quantificação relativa do gene alvo foi utilizada a seguinte equação, proposta por Pfaffl (2001):

$$R = 2^{[\Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ controle}]}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Nessa equação, a razão representa a expressão relativa do gene alvo, onde $\Delta Ct_{amostra}$ é a diferença entre o Ct do gene alvo (LIS) e o Ct dos genes constitutivos (β -actina e TEF) nas amostras de cada ponto analisado, $\Delta Ct_{controle}$ é a diferença entre o Ct do gene alvo e o Ct do gene constitutivo nas amostras de referência (dia 0).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES PARA CARACTERIZAÇÃO DE AMADURECIMENTO

Em grupos armazenados a 22°C, o perfil de cor da casca durante o amadurecimento do fruto foi bastante semelhante nos grupos tratado com MJ e controle (Figura 4).

Figura 4. Cor da casca em mamões 'Golden' mantidos a 22°C e tratados com 10 ppm de MJ por 24h a 22°C. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

Já para os grupos armazenados a 10°C, houve uma pequena diferença no perfil de coloração da casca (Figura 5), principalmente entre o 8º e 12º dias pós-tratamento (MJ e frio). O grupo controle 10°C apresentou a casca mais amarelada quando comparado ao grupo MJ 10°C.

Figura 5. Cor da casca em mamões 'Golden' armazenados a 10°C. O grupo MJ 10°C foi tratado por 2 vezes com 10 ppm de MJ a 22°C. Após o 10º dia, os frutos foram acondicionados a 22°C para o pleno amadurecimento. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

A Figura 6, mostra os frutos no 10º dia, no período que antecede a 2ª aplicação do hormônio. Neste momento, os frutos foram retirados da baixa temperatura e colocados em compartimento fechado a 22°C para mais um tratamento com 10 ppm de MJ por 24h. Visualmente é possível perceber diferença na aparência dos frutos dos dois grupos, sendo que o grupo controle 10°C apresenta a cor da casca mais amarelada em relação ao grupo MJ 10°C.

Figura 6. Mamões 'Golden' dos grupos controle e tratados com MJ 10 ppm, armazenados a 10°C, por 10 dias.

A mudança de coloração no mamão de verde para amarelo deve-se ao decréscimo de clorofila na casca e a síntese e revelação de carotenóides, pigmentos naturais responsáveis pela cor do fruto. O paralelo entre a atividade da clorofilase, enzima que atua na degradação de clorofila, e o processo de amadurecimento tem sido estabelecido, sabendo-se que à medida que decresce a concentração de clorofila, o fruto se aproxima do climatério (COSTA; BALBINO, 2002). Levando-se em consideração que o desenvolvimento da cor é um parâmetro normalmente associado ao progresso do amadurecimento do mamão, a análise de cor sugere que o MJ interferiu direta ou indiretamente através da estimulação do etileno, nas mudanças neste atributo de qualidade.

Quanto ao perfil de etileno (Figura 7), nota-se que o pico climatérico no grupo controle 22°C ocorreu no 1º dia pós-tratamento, que corresponde ao 4º dia pós-colheita destes frutos. No grupo MJ 22°C, não foi tão evidenciada a produção deste hormônio. Ao final do experimento, 6º e 7º dia pós-tratamento, ambos os grupos apresentaram produção de etileno semelhantes, quando os frutos começaram a apresentar sinais de senescência (maior suscetibilidade a

podridão peduncular e amolecimento intenso da casca e da polpa), particularmente no grupo controle. Apesar da inibição na produção de etileno observada no grupo tratado com MJ, esta não se refletiu em alterações na cor da casca dos frutos (Figura 4). Estes resultados estão em acordo com observações prévias encontradas na literatura, particularmente quanto às mudanças de cor no mamão, processo que para este fruto pode ser considerado etileno-independente (FABI et al, 2007).

Figura 7. Etileno em grupos de mamões 'Golden' mantidos a 22°C. Foram avaliados 7 dias pós-tratamento com MJ 10 ppm. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

Em grupos armazenados a 10°C (Figura 8), ocorreu o contrário em relação aos grupos mantidos exclusivamente a 22°C. No primeiro dia após o tratamento, foi detectado um aumento bastante expressivo, quando comparado ao grupo controle, dos níveis de etileno do grupo MJ 10°C. Após a segunda etapa do tratamento, no 10º dia, detectou-se aumento da produção de etileno em ambos os grupos, porém, mais evidente no grupo MJ 10°C. Após o 10º dia, o aumento na produção de etileno em ambos os grupos era esperado, mas as diferenças de comportamento foram nítidas: no grupo controle, antes mesmo da passagem para a temperatura de 22°C, os frutos começaram a produzir etileno em maiores quantidades e de modo contínuo, atingindo seu nível mais elevado no dia 11. Este comportamento não foi observado no grupo MJ 10°C, que manteve níveis próximos ao mínimo registrado no experimento, até o momento da passagem para 22°C. Após a passagem a indução na produção de etileno foi rápida atingindo, no máximo observado, o dobro da taxa observada no grupo controle.

Figura 8. Etileno em grupos de mamões 'Golden' mantidos a 10°C. Nas primeiras 24h os frutos foram armazenados a 22°C devido ao tratamento com MJ 10 ppm. Após, permaneceram até o 10º dia a 10°C. Quando foram retirados da baixa temperatura, submetidos novamente ao tratamento com MJ nas mesmas condições do primeiro dia e colocados a 22°C até o pleno amadurecimento. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

Em resumo, os dois tipos de armazenagem nos grupos tratados com MJ apresentaram comportamentos marcadamente diferentes quanto a produção de etileno. Contudo, resta evidente que o MJ é capaz de influenciar a biossíntese de etileno no mamão. No entanto, o modo como ocorre a ação ou produção de etileno pela influência do tratamento com MJ ainda não é claro (MATTHEIS; FAN; FELLMAN, 1998).

Muitos estudos indicam que a sinalização pelo ácido jasmônico e etileno ocorrem frequentemente de modo sinérgico para ativar a expressão de alguns genes relacionados a defesa após a inoculação de patógenos.

O etileno é captado pelos receptores de membrana ETR1, ERS1, ETR2, ERS2 e EIN4 que são reguladores negativos da resposta à este hormônio. Quando há ausência de etileno, estes receptores mantem a função de regulador positivo de CTR1, reprimindo o regulador positivo EIN2. Após a detecção do etileno, a repressão do CTR1 é atenuada permitindo a sinalização *downstream* através de EIN2. Assim, os reguladores positivos da expressão gênica sensíveis ao etileno, como EIN3 e EIL1, são ativados, uma vez que o complexo SCF^{EBF1/2}, dependente da degradação destas proteínas pelo proteassoma 26S, é inativado. Fatores de transcrição como ERF1 são responsáveis pela expressão *downstream* de genes responsivos a etileno (PIETERSE et al., 2013).

Foi demonstrado em *Arabidopsis* que ERF1 age como um regulador positivo para a sinalização do ácido jasmônico e etileno (LORENZO et al. 2003).

Recentemente, vários membros da família ERF demonstraram exercer uma função importante na mediação de respostas de defesa em *Arabidopsis*. O fator de transcrição de *Arabidopsis* MYC2 (McGRATH et al; 2005) também demonstrou ser uma proteína regulatória responsiva aos dois hormônios, sendo, assim, um ponto de *cross-talk* entre a sinalização do ácido jasmônico e etileno no contexto da defesa. Entretanto, MYC2 induz a expressão de ácido jasmônico mediante a expressão de genes responsivos a danos mecânicos, embora reprima a expressão de genes relacionados a patógenos. Isso indica que MYC2 regula de modos diferentes as respostas do ácido jasmônico na defesa contra patógenos e injúria em *Arabidopsis*. Há evidências de que as plantas modulam a abundância nos níveis de ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno, modificando a expressão de genes relacionados a defesa e coordenando interações complexas entre vias de sinalização de defesa para ativar uma resposta de defesa efetiva contra ataque de patógenos.

Entretanto, o modo como as plantas coordenam estas interações complexas e quais os mecanismos moleculares estão envolvidos ainda não estão claros (LORENZO; SOLANO, 2005; DOMBRECHT; et al, 2007).

Já com relação ao perfil de respiração de frutos armazenados a 22°C (Figura 9), pode-se dizer que o grupo controle, no início do experimento, apresentava níveis inferiores de produção de CO₂ quando comparado ao grupo MJ.

Figura 9. Perfil de respiração em grupos de mamões 'Golden' armazenados a 22°C, grupo controle e tratado com MJ 10 ppm. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

Em grupos mantidos a 10°C (Figura 10), o perfil de respiração demonstra um comportamento mais parecido entre os frutos, os quais

apresentaram o máximo de produção de CO₂ um dia após serem transferidos para 22°C (11º dia).

Figura 10. Perfil de respiração em grupos de mamões 'Golden' armazenados a 10°C. Ambos os grupos foram tratados a 22°C por 24h, permaneceram até o 10º dia a 10°C e foram acondicionados a 22°C para o pleno amadurecimento. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

Assim, tanto nos frutos mantidos exclusivamente a 22°C como no grupo armazenado a baixa temperatura, o MJ induziu aumento respiratório. Em frutos climatéricos é comum o aumento respiratório estar associado ao aumento na produção de etileno. Contudo, isto não parece muito claro para o grupo MJ armazenado a 22°C, pois em vários dos dias amostrados os níveis de etileno estavam nos menores níveis deste grupo, enquanto o nível respiratório era alto. A melhor relação entre aumento de produção de etileno e aumento respiratório foi encontrada no grupo mantido a 10°C. Como nos grupos controle, em ambos modos de armazenamento também mostraram esta relação entre níveis de etileno e respiração, é possível supor que a influência do MJ sobre a respiração tenha outro componente, não apenas dependente de sua influência sobre a produção de etileno, mas também dependente da temperatura.

4.2 CONCENTRAÇÃO DE MJ DURANTE O TRATAMENTO

As áreas dos picos foram comparadas (Figura 11) e os resultados indicam níveis muito semelhantes, com valores de áreas que correspondem a 1085791 para o frasco adotado como padrão e de 748507 para a caixa de 56L. A diferença entre estes valores pode ser atribuída ao fato dos frutos terem adsorvido parte do MJ, tornando-o indisponível para a detecção no ar do

interior da caixa. Portanto, o método de evaporação, empregado nos tratamentos dos frutos foi eficiente para proporcionar uma concentração de MJ próxima da esperada.

Figura 11. Análise do nível de MJ no interior da caixa para tratamento dos frutos. Na Figura A observa-se o padrão injetado de um frasco de 100 mL sob as mesmas condições em que a caixa permaneceu para tratamento. Já na Figura B observa-se o pico obtido pela injeção do ar no interior da caixa de 56L após 24h.

4.3 ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE AROMA

Além do linalool, outros 26 compostos (TABELA 4) foram identificados por CG-MS/SPME.

Os critérios estabelecidos para selecionar estes compostos foram a presença de notas aromáticas e espectros de massas com índice de similaridade acima de 70% com os espectros da biblioteca NIST 2008. A semelhança do espectro de massa e do tempo de retenção também foi verificada. Para os óxidos de linalool detectados, os quais possuem isômeros *cis* e *trans*, não foi possível diferenciá-los, sendo estabelecida a denominação óxido de linalool 1 e 2, conforme apresentado na TABELA 4.

TABELA 4. Compostos voláteis e suas respectivas descrições de notas de aroma.

Compostos Voláteis de Aroma	Notas Aromáticas
Hexanal	Gramma recém-cortada, verde.
Nonanal	Cítrico, melão, nuances de coco.
Óxido de linalool 1	Floral, amadeirado, herbáceo.
2,4-heptadienal	Verde, canela.
2-etil-1-hexanol	Frutado, doce.
Linalool	Floral, frutado.
β -ciclocitral	Açafrão, herbáceo.
2-pentilfurano	Frutado, nuances de caramelo.
6-metil-5-hepten-2-ona	Verde, maçã, banana, feijão.
Trans-2-octenal	Herbáceo, pepino.
1-octen-3-ol	Cogumelo, terra, fúngico.
Óxido de linalool 2	Floral, amadeirado, herbáceo.
Benzaldeído	Amêndoas, amadeirado, doce.
Fenilacetoneitrila	Amêndoa, doce.
Trans- β -ionona	Floral, amadeirado, frutado.
1-hexanol	Frutado, maçã, etéreo.
1-octanol	Frutado, cítrico.
Trans-geranil acetona	Floral, frutado (frutas tropicais).
Benzil Alcool	Frutado, balsâmico.
Citral	Casca de limão, amadeirado, herbáceo.
Furfural	Amadeirado, nozes, pão, caramelo.
Metil benzoato	Cânfora, fenólico.
Heptanal	Aldeídico, ervas frescas.
Isoamil Butirato	Maçã verde, hortelã, frutado.
1-heptanol	Herbal, frutas oleaginosas.
Ácido butanóico	Azedo, queijo, laticínios.

Fonte: The Good Scents Company, 2014

Destes, 21 compostos foram avaliados no experimento cuja aplicação de MJ ocorreu em 2 etapas e 22 compostos no experimento em que os frutos receberam somente uma aplicação do hormônio (TABELA 5). Nos grupos que permaneceram a 22°C, foram identificados os mesmos compostos voláteis avaliados no grupo que recebeu somente uma aplicação de MJ.

TABELA 5. Comparação entre compostos voláteis de grupos que receberam uma e duas aplicações de MJ e armazenamento a 10°C.

Compostos Voláteis de Aroma	MJ A1	MJ A2
Hexanal		
Nonanal		
Óxido de linalool 1		
2,4-heptadienal		
2-etil-1-hexanol		
Linalool		
β -ciclocitral		
2-pentilfurano		
6-metil-5-hepten-2-ona		
Trans-2-octenal		
1-octen-3-ol		
Óxido de linalool 2		
Benzaldeído		
Fenilacetona		
Trans- β -ionona		
1-hexanol		
1-octanol		
Trans-geranil Acetona		
Benzil Alcool		
Citral		
Furfural		
Metil benzoato		
Heptanal		
Isoamil Butirato		
1-heptanol		
Ácido butanóico		

Tabela 5. Compostos Voláteis identificados por CG-MS/SPME em dois experimentos diferentes a 10°C. A coluna ' MJ A1' está relacionada a uma só aplicação do hormônio no dia 0. Já a coluna ' MJ A2' apresenta os compostos que foram selecionados no experimento que contou com duas aplicações de MJ 10 ppm no dia 0 e 10. Os quadrados em branco significam ausência do composto, enquanto o preenchimento indica a presença do composto.

Em geral, os ésteres são grandes contribuintes para o aroma dos frutos. Metil e etil ésteres similares aos encontrados por Pino, Almora e Marbot (2003) em mamões *Maradol*, também foram identificados em outros frutos tropicais como maracujá, goiaba e abacaxi. No caso dos mamões da cultivar 'Golden', os ésteres metil benzoato e isoamil butirato, foram encontrados particularmente em amostras de frutos que foram armazenadas a baixa temperatura.

No mamão *Golden*, parte dos voláteis é proveniente do metabolismo de ácidos graxos, mediado por enzimas da via da lipoxigenase (LOX). Após o ataque de insetos, por exemplo, aumenta a produção de voláteis de seis carbonos (C6) caracteristicamente formados por esta via. Já outros compostos

são produzidos após algumas horas de injúria, como muitos mono e sesquiterpenos. A estimulação da produção destes compostos pode ocorrer também pela aplicação de substâncias, como os jasmonatos (ALBORN et al., 1997; BOLAND et al., 1995).

Muitos dos álcoois, aldeídos, ácidos e carbonilas encontradas no fruto são derivados da degradação oxidativa dos ácidos linoleico e linolênico. Após a ação da LOX, os ácidos hidroperoxilinoles, resultantes deste processo, passam por clivagem pela hidroperóxido liase, resultando em vários produtos que incluem o hexanal e nonanal, por exemplo. (ROWAN; et al, 1999).

Outros compostos encontrados no aroma do mamão, como benzaldeído e fenilacetoneitrila são sintetizados pela degradação de aminoácidos, enquanto 2-pentilfurano é derivado do metabolismo de carboidratos. Compostos como β -ionona, β -ciclocitral, e geranil acetona são, por sua vez, obtidos pela clivagem de carotenóides (SCHWAB; RIKANATI; LEWINSOHN, 2008) por enzimas oxidativas, com destaque para as CCDs (*Carotenoid cleavage dioxygenases*) (IBDAH; et al., 2006). Em tomates, β -ionona, geranil acetona e 6-metil-5-hepten-2-ona tem sua biossíntese aumentada de 10 a 20 vezes durante o amadurecimento do fruto. Embora a β -ionona esteja presente em pequenas concentrações, seu poder odorífero é bastante significativo, o que faz com que este seja o segundo composto volátil de maior impacto no tomate (SIMKIN; et al, 2004).

O metil benzoato, sintetizado a partir do ácido benzóico, é um componente comumente encontrado em flores e tem por função atrair insetos polinizadores. Já as metilcetonas de cadeia curta (C_5 - C_{11}), são compostos de aroma encontrados com frequência no Reino Vegetal e dotados de alto poder odorífero como a 6-metil-5-hepten-2-ona identificada nos quatro grupos de tratamento deste experimento (SCHWAB; RIKANATI; LEWINSOHN, 2008).

Tomando as áreas normalizadas dos compostos identificados nos diversos grupos de frutos, processou-se a análise de componentes principais (ACP) como forma de discriminar os efeitos dos tratamentos sobre o perfil global do aroma. É um método que visa escolher as formas mais representativas dos dados a partir de combinações lineares das variáveis originais. Quanto maior a decomposição do vetor sobre o eixo (distância em relação ao centro), mais significativa é a variável para diferenciar as amostras.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software Statistica 8.0[®] de modo que cada composto foi tratado como uma variável e foram utilizados conjuntos de dados obtidos pelas áreas normalizadas nos cromatogramas para cada composto. Desta forma, obteve-se na ACP cerca de 51,12% de variância acumulada na soma das componentes principais 1 e 2 (Figura 12). Esta ACP representa o melhor arranjo gráfico para o experimento cujos frutos controle e MJ foram armazenados a 10°C e receberam duas aplicações de MJ.

Figura 12. Análise de Componentes Principais obtida pelas áreas normalizadas dos cromatogramas gerados pelo software do CG-MS em grupos armazenados a 10°C controle e MJ 10 ppm (duas aplicações). As duas componentes principais juntas são responsáveis por explicar 51,12% das informações acerca dos voláteis de aroma do mamão 'Golden'. A nomenclatura na projeção das observações são referentes aos nomes das amostras. Assim "m" ou "c" significam frutos que foram tratados com metil jasmonato ou controle, respectivamente. O número após a letra indica o dia pós-tratamento e o último número "1" ou "2" significa o número da replicata.

Correlacionando o gráfico da projeção das variáveis com a projeção das observações, verifica-se que o principal composto que se destaca é o linalool. Sendo mais abundante nas amostras dos primeiros dias, tanto no grupo controle quanto no grupo MJ 10°C.

Benzaldeído, heptanal, β -ionona e trans-2-octenal estavam presentes em maiores concentrações em amostras de frutos do grupo controle mantidas a 10°C quando comparado ao grupo MJ mantido a mesma temperatura. Embora o ácido butanóico não apresente um autovetor tão significativo em relação aos demais compostos, este volátil esteve presente em frutos controle principalmente após o 13º dia de armazenamento. Este composto pode ser considerado um *off-flavor*, ou seja, um composto volátil de aroma desagradável descrito como “azedo”. Desta forma, o tratamento com MJ pareceu evitar ou retardar a biossíntese deste composto.

Por ser o composto mais abundante tanto em grupos armazenados a 22°C como a 10°C e, dada a sua significativa contribuição para o aroma do mamão ‘Golden’, realizou-se uma análise mais detalhada das mudanças dos níveis de linalool produzidos nos frutos dos diferentes grupos, durante o amadurecimento. Para isso, foi utilizada a área normalizada obtida dos cromatogramas. A Figura 13 apresenta o perfil de linalool no grupo mantido a 22°C. Neste caso, observa-se um aumento de aproximadamente 50% nas primeiras 24 horas do experimento, mas não foi possível detectar uma variação significativa da produção deste volátil de aroma que fosse influenciada pelo tratamento com MJ. De todo o modo, é importante salientar que os níveis de linalool são relativamente altos nos frutos de mamão em estágio 1 a 2 de maturação (de 10 a 25% de coloração amarela na casca) como os empregados nestes experimentos.

Figura 13. Perfil comparativo de Área Normalizada de Linalool em diferentes dias de tratamento para grupo Controle e MJ 10 ppm na amostragem cujos frutos permaneceram a 22°C. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

Já na Figura 14 observa-se que o grupo que recebeu somente uma aplicação de MJ foi fortemente influenciado pela baixa temperatura à qual os frutos foram submetidos a partir do 1º dia até o 10º dia pós-tratamento. Do 11º dia em diante foi possível visualizar que em ambos os grupos mantidos a 10°C (controle e MJ) houve aumento dos níveis de linalool. Contudo no grupo tratado com o hormônio a recuperação foi mais expressiva, atingindo aproximadamente a metade dos valores registrados um dia antes da transferência para a baixa temperatura.

Figura 14. Perfil comparativo de Área Normalizada de Linalool em diferentes dias de tratamento para grupo Controle e MJ 10 ppm na amostragem cujos frutos permaneceram a 10°C e que recebeu somente um tratamento com MJ 10 ppm. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

Os frutos que receberam duas aplicações de MJ e permaneceram à baixa temperatura apresentaram comportamento similar aos frutos que receberam somente uma aplicação de MJ. A produção de linalool diminuiu drasticamente após o 3º dia pós-tratamento e após a saída dos frutos da baixa temperatura detectou-se um gradual aumento nos níveis de linalool (Figura 15). No entanto, em ambos os grupos (uma e duas aplicações de MJ), o resultado observado no 15º dia pós-tratamento, em ambos os grupos (uma e duas aplicações de MJ), indica que o linalool está mais abundante nas amostras tratadas com MJ. Desta forma, quando comparado ao grupo controle, o tratamento com MJ aumentou os níveis de linalool quando os frutos apresentavam-se maduros.

Figura 15. Perfil comparativo de Área Normalizada de Linalool em diferentes dias de tratamento para grupo Controle e MJ 10 ppm na amostragem que recebeu duas aplicações de MJ e armazenamento a 10°C. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

Deve-se destacar também que quando comparada às amostras controle a 10°C, os frutos tratados com MJ apresentaram ao final do experimento no 15º dia, níveis mais abundantes de linalool do que os frutos do grupo controle. Isto ocorreu tanto no experimento em que houve uma só aplicação de MJ como também com duas aplicações do hormônio.

Durante o amadurecimento os compostos são biossintetizados em períodos diferentes, caracterizando de maneira distinta cada amostra. Portanto, além dos compostos serem influenciados pelos tratamentos (MJ e frio), há também influência do tempo no decorrer do amadurecimento.

Portanto, para uma melhor visualização dos efeitos dos tratamentos, foram selecionadas análises que consideravam os compostos voláteis comuns a todos os experimentos apresentados em dias específicos (Figura 16, Figura 17, Figura 18).

Em uma comparação entre frutos tratados somente com uma ou duas aplicações de MJ e mantidos a 10°C (Figura 16), no 11º dia pós-tratamento, quando já haviam saído da baixa temperatura, observa-se que há um agrupamento à direita de frutos que receberam somente uma aplicação de MJ (a1). Enquanto os frutos que receberam duas aplicações (a2) encontram-se agrupados à esquerda. De fato esta distribuição no gráfico dos frutos controle e tratados com MJ do grupo a2 parece refletir maior influência dos compostos

linalool e óxidos de linalool. Observando o gráfico dos níveis de linalool (Figura 17), de fato os frutos tratados com MJ do grupo a2 apresentam níveis de linalool próximos ao grupo controle, pois verifica-se pela ACP que os controles de a2 tem o mesmo perfil dos frutos tratados e encontram-se na mesma região do gráfico.

Figura 16. Análise de componentes principais para os compostos voláteis do dia 11 (após a transferência dos frutos de 10°C para 22°C) nos dois experimentos realizados. “C” significa controle e “M” metil jasmonato. A identificação a1 significa que o grupo recebeu somente uma aplicação de MJ, enquanto a2 significa que os grupos receberam duas aplicações de MJ 10 ppm.

Visando comparar os grupos armazenados a baixa temperatura que receberam uma ou duas aplicações de MJ (a1 e a2, respectivamente), processou-se a ACP com frutos maduros destes grupos, juntamente com seus controles, nas amostras coletadas no dia 15 (Figura 17). Novamente os grupos de a2, neste caso tratados com MJ, apresentam distribuição no gráfico que refletem maior influência dos níveis de linalool. Diferentemente do 11º dia, aqui o grupo controle encontra-se mais distante do grupo tratado com MJ em a2. O que nos permite concluir que as amostras de a2 controle e tratadas com MJ, tem uma composição de voláteis de aroma mais diferenciada entre elas, que as do grupo a1. Apesar dos grupos de a2 terem mais influência de linalool e óxidos de linalool que os grupos de a1, também é interessante destacar que os grupos de a1 apresentam influencia de compostos como hexanal, β -ciclocitral e trans-geranil acetona. Estes são dotados de um alto poder odorífero e são constituintes do “*flavor*” do mamão ‘Golden’. Neste caso, a análise sensorial dos frutos poderia demonstrar se o efeito é positivo em termos de aceitabilidade para o consumidor e verificar qual tipo de protocolo de tratamento com MJ poderia trazer maiores benefícios para a qualidade do mamão.

Figura 17. Análise de componentes principais para os compostos voláteis no dia 15, nos dois experimentos realizados. “C” significa controle e “M” metil jasmonato. A identificação a1 significa que o grupo recebeu somente uma aplicação de MJ, enquanto a2 significa que os grupos receberam duas aplicações de MJ 10 ppm.

Uma vez que o armazenamento a baixa temperatura provoca diminuição da emissão de voláteis em mamões, seria desejável que os tratamentos com MJ pudessem resgatar a capacidade do fruto em produzir níveis normais de compostos do aroma. Para verificar se os protocolos adotados nestes experimentos atingiram tal objetivo, foram introduzidas nas ACPs os dados relativos aos níveis de voláteis das amostras controle e MJ mantidas exclusivamente a 22°C. Como exemplificado pelo linalool (Figura 13), o armazenamento a esta temperatura pode ser considerado o mais próximo do normal, dentre todas as condições analisadas nestes experimentos, produzindo níveis de compostos voláteis com pouca influência de tratamentos pós-colheita. A introdução de frutos controle e tratado com MJ à ACP anterior não alterou o perfil já observado acima (Figura 17). Fica claro que o grupo tratado com MJ que recebeu 2 aplicações de MJ é o que mais se assemelha ao grupo mantido a 22°C. Ou seja, o perfil global de voláteis de ambos os grupos é mais similar que os dos outros grupos presentes analisados. Isto tornaria este tratamento o mais promissor, no que se refere ao resgate da capacidade do fruto em produzir compostos do aroma em níveis similares aos de um fruto não submetido a processos de conservação pós-colheita.

Figura 18. ACP com frutos maduros provenientes do experimento a 22°C, 10°C (uma aplicação de MJ) e 10°C (2 aplicações de MJ). Avaliação de compostos de aroma comuns aos três experimento. “C” significa controle e “M” metil jasmonato. A identificação a1 significa que o grupo recebeu somente uma aplicação de MJ, enquanto a2 significa que os grupos receberam duas aplicações de MJ 10 ppm. A nomenclatura “d15” se refere ao 15º dia pós-tratamento com MJ. Enquanto “c” ou “m” se referem aos grupos controle e metil jasmonato, respectivamente. Enquanto “a1” ou “a2” significa que o grupo foi tratado por 1 ou 2 vezes com metil jasmonato.

Com relação aos compostos voláteis de seis carbonos (C6-voláteis), produzidos pela via LOX, há um mecanismo de *feedback* positivo que auto regula a biossíntese de jasmonatos. Uma vez que a expressão de vários genes da via de AJ, tais como os que codificam a expressão de LOX e aleno óxido sintase (AOS) é aumentada pelo tratamento com MJ (BELL; MULLET, 1993; SIVASANKAR, et al., 2000).

Portanto, a indução da LOX pela aplicação de jasmonatos, pode fazer com que a planta apresente maior resistência a patógenos, aumente a capacidade de sintetizar derivados de compostos lipídicos utilizados em sua defesa ou voláteis (CREELMAN; MULLET, 1995; ALBORN et al., 1997). Assim, análises para avaliar a evolução do composto hexanal durante o tratamento demonstram que não só o MJ, mas também o frio, agem sinergicamente aumentando os níveis deste composto mesmo em frutos que se encontram em estádios mais avançados de maturação. Em frutos controle mantidos a 22°C (Figura 19) e mesmo naqueles tratados com MJ, a produção de hexanal tende a diminuir com o avanço da maturação, no entanto, os tratamentos com frio e MJ pareceram estimular a via da LOX aumentando consequentemente os níveis de hexanal (Figura 20 e Figura 21).

Figura 19. Perfil comparativo de Área Normalizada de Hexanal em diferentes dias de tratamento para grupo Controle e MJ 10 ppm na amostragem cujos frutos permaneceram a 22°C. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

A ação do MJ sobre a via LOX parece ser similar em frutos de famílias botânicas distintas. Em framboesa, o tratamento com MJ demonstrou aumento nos níveis de hexanal (Dados não publicados), assim como ocorrido para o mamão. Isso demonstra que frutos submetidos ao tratamento com MJ e mantidos a baixa temperatura estão mais suscetíveis ao estresse e desta forma, a via LOX é mais estimulada, produzindo hexanal que é um composto também envolvido em mecanismos de defesa. A capacidade de espécies vegetais diferentes produzirem grupos de compostos semelhantes é atribuída à conservação durante a evolução dos mesmos genes que codificam enzimas com características similares (AHARONI; et al, 2004) que dada a relevância para a defesa ou perpetuação da espécie foram mantidos durante a evolução.

Em ambos os protocolos com uma ou duas aplicações de MJ e frutos mantidos a baixa temperatura, é possível perceber que a influência do frio foi fundamental para estimular a produção de hexanal (Figura 20, Figura 21). Já que o mesmo efeito não foi observado em frutos tratados com MJ e mantidos a 22°C.

Figura 20. Perfil comparativo de Área Normalizada de hexanal em diferentes dias de tratamento para grupo Controle e MJ 10 ppm na amostragem cujos frutos permaneceram a 10°C com uma aplicação de MJ 10 ppm. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

No entanto, o protocolo com duas aplicações de MJ pareceu ser mais eficiente pois foi capaz de manter altos níveis de hexanal até o 13º dia pós-tratamento, o que não ocorreu para seu respectivo controle que após o 7º dia

pós-tratamento começou a apresentar drástica diminuição nos níveis de hexanal.

Figura 21. Perfil comparativo de Área Normalizada de hexanal em diferentes dias de tratamento para grupo Controle e MJ 10 ppm na amostragem cujos frutos permaneceram a 10°C com duas aplicações de MJ 10 ppm. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

Por fim, a ACP com os três grupos (22°C, a1 e a2) (Figura 18), demonstra que o experimento cujos frutos receberam 2 aplicações de MJ apresenta um perfil de voláteis mais semelhante aos frutos maduros (dia 7) que permaneceram a 22°C, que poderiam ser considerados prontos para o consumo. O composto linalool apresenta maior influência da CP2 do que da CP1, o que pela projeção das observações, corresponde às amostras tratadas com MJ (2 aplicações) e amostras que permaneceram a 22°C.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE MJ NA POLPA DOS FRUTOS

Com o mesmo intuito da análise do efeito dos tratamentos sobre os níveis de etileno, foram avaliados as possíveis alterações na produção endógena de MJ (Figura 22). Em grupos mantidos a 22°C, observa-se que o grupo controle obteve um perfil que pouco oscilou no decorrer do amadurecimento. Este comportamento é esperado visto que este grupo não sofreu estresse como variação de temperatura, nem mesmo aplicação exógena de hormônios. Para o grupo MJ 22°C, observa-se um aumento brusco de MJ no 5º dia pós tratamento. Sendo que após este período, foi registrado decréscimo do nível de MJ.

Figura 22. Quantificação de MJ em grupos de mamões armazenados a 22°C. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

Por outro lado, a Figura 23 mostra que o grupo controle que passou por um período de 10 dias de armazenamento a baixa temperatura apresentou, no 11º dia, altos níveis endógenos de MJ, superiores aos encontrados em grupos que foram submetidos ao tratamento com MJ e mantidos em condições similares. Devido ao estresse proporcionado pelo frio, os frutos apresentaram oscilações nos níveis de MJ do início ao término do experimento. O estresse gerado no fruto pela baixa temperatura pode ter influenciado o comportamento do grupo controle. Este mesmo efeito pode ter sido inibido em função do tratamento com MJ. É importante notar que, apesar do tratamento com MJ, não foram detectados altos níveis do hormônio nas primeiras 24 horas. Neste caso, é possível supor que o MJ ligue-se a seus receptores e dispare a sinalização, mas permaneça por pouco tempo nos tecidos do fruto, difundindo-se para o ambiente ou, em outra hipótese, seja rapidamente metabolizado.

Figura 23. Quantificação de MJ em grupos armazenados a 10°C. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

4.5 EXPRESSÃO DO GENE DE LINALOOL SINTASE (LIS)

Com os sete pontos analisados que correspondem aos dias após o tratamento, foi possível avaliar o padrão da transcrição de uma linalool sintase (*LIS*) durante o amadurecimento (Figura 24). A expressão relativa aumentou significativamente no grupo tratado com MJ e mantido exclusivamente a 22°C a partir do 1º dia, chegando a quase o dobro do registrado para a amostra controle 22°C ao final do experimento, no dia 7. Já para os grupos a 10°C, não houve diferença significativa entre o grupo tratado com MJ e controle.

Figura 24. Expressão relativa de LIS, utilizando β -actina como gene normalizador. Foram avaliados os 4 grupos em sete pontos que correspondem aos dias após o tratamento com MJ. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

A Figura 25 apresenta a expressão relativa de LIS normalizada pelo nível de transcritos do gene codificador do fator de alongamento de transcrição 1α (TEF). Neste caso, a expressão relativa aumentou significativamente no grupo MJ 22°C, assim como no 13º dia do grupo MJ 10°C.

Figura 25. Expressão Relativa de LIS utilizando TEF como gene normalizador. Foram avaliados os 4 grupos em sete pontos que correspondem aos dias após o tratamento com MJ. Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).

Também ficou claro que o armazenamento a baixa temperatura afetou a transcrição de LIS nos frutos, já que a partir do 1º dia de experimento foram encontrados valores mais baixos nos grupos controle. Após a transferência para 22°C no 11º dia, os níveis de transcritos encontrados aumentaram gradativamente, mas o grupo MJ 10°C somente apresentou valores mais altos no 13º dia.

Os dados obtidos para a expressão gênica podem ser correlacionados com o que foi observado nas análises de voláteis de aroma. Os frutos submetidos à baixa temperatura tiveram redução na abundância de linalool em relação às quantidades detectadas nas amostras mantidas exclusivamente a 22°C. Em grupos tratados com MJ, o linalool foi detectado em maiores níveis nos dias 5 e 13, para os grupos a 22°C e 10°C, respectivamente. Apesar do número de transcritos ser superior no grupo MJ 22°C, a produção de linalool não foi aumentada na mesma proporção. Neste caso, pode-se supor que

geranil difosfato (GPP) pode limitar a produção de linalool mesmo com abundância de LIS.

Apesar das divergências entre os gráficos que utilizaram actina e TEF como genes normalizadores, pode-se dizer que há uma tendência do grupo MJ 10°C apresentar níveis superiores de transcritos em ambas as situações. Isso pode indicar que o MJ pode estar relacionado à indução de transcrição de *LIS*. Alterações nos níveis de transcritos de *LIS* afetam também a formação de linalool no mamão, o que indica que possivelmente a regulação da biossíntese desse monoterpene ocorra na etapa da transcrição. No entanto, também é válido destacar que mecanismos de regulação pós-traducionais, podem fazer com que a quantidade de proteína expressa, ou seja, de LIS sintetizada, não seja necessariamente proporcional à quantidade de seu mRNA correspondente. De todo o modo, é possível sugerir que os efeitos exercidos pelo MJ na produção de linalool devem-se, ao menos parcialmente, a uma regulação, direta ou indireta, da transcrição do gene da linalool sintase.

5 CONCLUSÕES

A aplicação exógena de MJ em mamões 'Golden' influenciou a biossíntese de compostos voláteis de aroma, particularmente do linalool, composto de impacto do aroma do fruto e também de hexanal. Houve uma variação significativa quando avalia-se o efeito da temperatura e do tratamento com duas aplicações de MJ, principalmente em relação aos produtos das vias de terpenos e LOX, exemplificado pelo incremento nos níveis dos compostos linalool e hexanal. Ambas as vias estão envolvidas com processos de defesa de vegetais contra estresses bióticos e abióticos, o que pode ser relacionado a melhor aparência dos frutos tratados com MJ em comparação com os frutos controle. Em relação ao mecanismo, ao menos no que concerne o linalool, os resultados indicam que o estímulo da transcrição do gene de uma linalool sintase deve ser um dos pontos de regulação da síntese do composto e que o MJ deve ser um dos fatores envolvidos. Confirmando os resultados obtidos por González-Aguilar, Tiznado-Hernandez & Wang (2006), pode-se dizer que o tratamento com MJ, principalmente no grupo que foi submetido à baixa temperatura, reduziu a deterioração dos frutos. Isso os tornou mais atrativos quando comparados aos frutos controle.

Nos últimos 20 anos, foram encontrados trabalhos em que frutos e hortaliças apresentaram melhoras de qualidade influenciadas pelo tratamento com MJ, como incremento de aroma, cor e compostos bioativos. Sabe-se que o tratamento com MJ depende de inúmeros fatores e pode ainda apresentar variações em resultados de acordo com o tipo de cultivar, estágio de maturação ou órgão vegetal empregado. Portanto, alterações no método, concentração de MJ, tempo de aplicação do hormônio e até mesmo uma aplicação pré-colheita poderiam ser testados em trabalhos futuros com o intuito de avaliar o efeito deste mesmo tratamento em outros frutos, a fim de que se trace um perfil comparativo para os compostos voláteis de aroma e tratamentos hormonais.

Há inúmeras combinações de concentração, tempo de tratamento, estado fisiológico do fruto e técnicas para aplicar o hormônio e resta evidente que outros protocolos devam ser testados. Contudo, é possível afirmar que o MJ é uma alternativa tecnológica interessante com potencial para manter a

qualidade do mamão e com potencial para compor o rol de tratamentos empregados na conservação pós-colheita do fruto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AHARONI, A.; et al. Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. **The Plant Cell**, 16: 3110-3131, 2004.

ALBORN, H.T.; TURLINGS, T.C.; STENHAGEN, G.; LOUGHRIN, J.H. TUMLINSON, J.H. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. **Science** , n. 276, p. 945- 949, 1997.

ALMORA, K.; et al. Evaluation of the volatile from ripening papaya (*Carica papaya* L. var. Maradol roja). **Food Chem.** 86: 127-30, 2004.

ADIE, B.A.; et al. ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. **Plant Cell**, 19: 1665-81, 2007.

ALONSO, M. J.; ECKER, J. R. The ethylene pathway: a paradigm for plant hormone signaling and interaction. **Sci. Stk** , n. 70, p. 1-10, 2007.

BARROS, F.M.C; et al. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (*Verbenaceae*). **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.4, 2009.

BELL, E. A.; CHARLWOOD, B. V. Secondary Plant Products. New York: Springer-Verlag, p. 674, 1980.

BELL, E. MULLET, J. E. Characterization of an Arabidopsis-lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. **Plant Physiol.** 103:1133-1137, 1993.

BLANCH, G.P., FLORES, G., CASTILLO, M.L.C. Influence of methyl jasmonate in conjunction with ethanol on the formation of volatile compounds in berries belonging to the Rosaceae. **Postharvest Biology and Technology**, v. 62, p. 168–178, 2011.

BOLAND, W.; HOPKER, J. DONATH, J.; NÜSKE, J.; BUBLITZ, F. Jasmonic acid and coronatin induce odor production in plants. **Angew Chemical** (Int. Edn. English), v. 34, p. 1600-1602, 1995.

BROETTO, S. G. **Clonagem e análise da expressão de genes de proteínas de mamão papaia com atividade inibitória sobre poligalacturonases fúngicas**. 2013. Tese (Doutorado em Bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-01102013-144633/>>. Acesso em: 13.out.2014.

CASTRO, I.M; ANJOS, M.R; OLIVEIRA, E.S. Determinação de isotiocianato de benzila em *Carica papaya* utilizando cromatografia gasosa com detectores seletivos. **Quimica Nova**, 31 (8): 1953-1959, 2008.

CHEN, N. M.; PAULL R. E. Development and prevention of chilling injury in papaya fruit. **Journal America Society Hortscience** 114, 639-643, 1986.

COSTA, A. de F. S., BALBINO, J. M. de S. Características da fruta para exportação e normas de qualidade. In: FOLEGATTI, M. I. da S., MATSUURA, F. C. A. U. (Ed.). Mamão: pós-colheita. **Embrapa Informação Tecnológica**. 59 p. (Frutas do Brasil, 21), 2002.

CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** , v. 92, p. 4114-4119, 1995.

CROTEAU, R., KUTCHAN, T.M., LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Rockville, MD: **American Society of Plant Physiologists**, 1250-1318, 2000.

DING, C. K.; et al. Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate. **Plant Science**, 161, 1153–1159, 2001.

DIXON, J., HEWETT, E.W. Factors affecting apple aroma/flavor volatile concentration: a review, **N. Z. J. Crop Hort. Sci**, 28:155-173,1992.

DUDAREVA, N., PICHERSKY, E., GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiol.** 135: 1893-1902, 2004.

FABI, J.P.; CORDENUNSI, B.R.; BARRETO, G.P de M.; MERCADANTE, A.Z.; LAJOLO, F.M.; NASCIMENTO, J.R. do. Papaya fruit ripening: response to ethylene and 1-methylcyclopropene. **J. Agric. Food Chem**, 55: 6118-6123, 2007.

FABI, J.P., SEYMOUR, G.B., GRAHAM, N.S., BROADLEY, M.R., MAY, S.T., LAJOLO, F.M., DO NASCIMENTO, J.R.O. Analysis of ripening-related gene expression in papaya using an Arabidopsis based microarray. **BMC Plant Biology**, v. 12, 242, 2012.

FAO, Statistics Database 2011 (FAOSTAT). Food and Agriculture Organization, 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 05.abr.2013.

FAOSTAT. Papayas: U.S. Import-eligible countries; world production and exports, 2010. Disponível em: <<http://faostat.fao.or/default.aspx>>. Acesso em: 04.maio.2012.

FARMER, E. E. and RYAN, C. A. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 87: 7713–7716, 1990.

FLATH, R.A., FORREY, R.R. Volatile components of Papaya (*Carica papaya* L. Solo variety). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 25: 103-109, 1977.

FLATH, R.A., et al. Headspace examination of volatile emissions from ripening papaya. (*Carica papaya* L., Solo variety). **J. Agric. Food Chem**, 38:1060-3, 1990.

FRANCO, M.R.B., RODRIGUES-AMAYA, D.B. Volatile components of two papaya cultivars. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**. 36 (3): 613-632, 1993.

FUGGATE, J., SILES, X., CAMPOS, H. Carotenoid concentrations in vegetable and fruits common to the Costa Rican diet. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 55 (2): 101-113, 2004.

GOMES, B. L. **Efeitos da conservação de mamão (*Carica papaya* cv. Golden) a baixa temperatura sobre os compostos voláteis constituintes do aroma**. 2012. Dissertação (Mestrado em Bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-03102013-155410/>>. Acesso em: 12.out.2014.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; et al. Methyl jasmonate reduces chilling injury and maintains postharvest quality of mango fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48: 515–519, 2000.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A., et al. Methyl Jasmonate treatments reduce chilling injury and the defense response of guava fruits. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, 313: 694-701, 2004.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A., BUTA, J. A., WANG, C. Y. Methyl jasmonate and modified atmosphere packaging (MAP) reduce decay and maintain postharvest quality of papaya “Sunrise”. **Postharvest Biology and Technology**. 28:361-370, 2003.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A; TIZNADO-HERNÁNDEZ, M.E; WANG, C.Y. Physiological and biochemical responses of horticultural products to methyl jasmonate. **Stewart Postharvest Review**, 1:1, 1-10, 2006.

HULBERT, S. H.; WEBB, C. A.; SMITH, S. M.; SUN, Q. Resistance gene complexes: Evolution and utilization. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 285-312, 2001.

IBDAH, M.; et al. Functional characterization of CmCCD1, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. **Phytochemistry**, v. 67, n. 15, p. 1579 – 1589, 2006.

JACOMINO, A.P., BRON, I. U., KLUGE, R.A. Avanços em Tecnologia pós-colheita de mamão. **Papaya Brasil**, 2003.

JIN, P.; et al. Low temperature conditioning combined with methyl jasmonate treatment reduces chilling injury of peach fruit. **J Sci Food Agric**, 89: 1690–1696, 2009.

KENDE, H. Ethylene Biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. Palo Alto, v. 44, p. 283-307, 1993.

KONDO, S., et al. Aroma volatile biosynthesis in apples affected by 1-MCP and methyl jasmonate. **Postharvest Biol. Technol.** 36:61-68, 2005.

LEE, S., KADER, A. Preharvest and Postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biol. Tech.** 20:207-20, 2000.

LELIÈVRE, J.M.; LATCHÉ, A.; JONES, B.; BOUZAYEN, M.; PECH, J.C. Ethylene and fruit ripening. **Physiologia Plantarum**, 101:727-739, 1997.

LORENZO, O.; PIQUERAS, R.; SANCHEZ-SERRANO, J.J.; SOLANO, R. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defence. **Plant Cell** 15:165–178, 2003.

LORENZO, O.; SOLANO, R. Molecular players regulating the jasmonate signaling network. **Curr Opin Plant Biol** 8:532–540, 2005.

LURIE, S., et al. Effect of 1-methylcyclopropene on volatile emission and aroma in cv. Anna apples, **J. Agric. Food Chem.** 50: 4251-4256, 2002.

MAINARDI, J. A.; PURGATTO, E.; VIEIRA JR, A.; BASTOS, W.A.; CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, R.O.; LAJOLO, F.M. Effects of Ethylene and 1-Methylcyclopropene (1-MCP) on Gene Expression and Activity Profile of a α -1,4-glucan-phosphorylase during Banana Ripening. **J. Agric. Food Chem.**, 54: 7294-7299, 2006.

MATTHEIS, J.P.; FAN, X; FELLMAN, J.K. Response of apples to postharvest jasmonate treatments. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 123(3): 421-425, 1998.

MATSUI, K. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol*, 9: 274-280, 2006.

MASON, H. S.; MULLET, J.E. Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wound, and jasmonic acid. **The Plant Cell**, 2: 569-579, 1990.

McGRATH, KC, DOMBRECHT, B, MANERS, JM et al. Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression. **Plant Physiol** 139:949–959, 2005.

MEIR, S.; et al. Reduction of chilling injury in stored avocado, grapefruit, and bell pepper by methyl jasmonate. **Can. J. Bot.** 74: 870-874, 1996.

MELAN, M.A.; et al. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid and methyl jasmonate. **Plant Physiol**, 101:441-450, 1993.

MORENO, F., et al. Impact of Postharvest methyl jasmonate treatment on the volatile composition and flavonol content of strawberries. **J. Sci Food Agric.** 90:989-994, 2009.

OLIVER, R.P.; IPCHO, S. V. S. *Arabidopsis* pathology breathes new life into the necrotrophs-vs. biotrophs classification of fungal pathogens. **Molecular Plant Pathology**, v.5, n.4, p.347-352, 2004.

PALIYATH, G; et al. Postharvest biology and technology of fruits, vegetables and flowers. Iowa: Wiley-Blackwell, 2008.

PARÉ, P.W., TUMLINSON, J.H. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. **Plant Physiology**, 121: 325-331, 1999.

PIERTERSE, C.M.J; et al. Induced plant responses to microbes and insects. **Front. Plant Sci**, 4:475, 2013.

PINO, J.A., ALMORA, K. MARBOT, R. Volatile components of papaya (*Carica papaya* L., Maradol variety) fruit. **Flav. Frag**, 18: 492-6, 2003.

RIVERA-DOMINGUEZ, M, et al. Induction of the expression of defense genes in *Carica papaya* fruit by methyl jasmonate and low temperature treatments. **Electronic Journal of Biotechnology**, 15 (5), 2012. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info>>. Acesso em: 23.mar.2013.

ROHMER, M. Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis: elucidation and distribution. **Pure Appl. Chem**, 75:375-388, 2003.

ROHWER, C.L.; ERWIN, J.E. Horticultural applications of jasmonates: a review. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**. 83 (3) 283–304, 2008.

ROWAN, D., et al. Biosynthesis of straight-chain ester volatiles in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labeled precursors, **J. Agric. Food Chem**, 47:2553, 1999.

RYAN, C.A.; PEARCE G.L. Polypeptide hormones. **Plant Physiology**, 125: 65-68, 2001.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., & MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 ed., **Cold Spring Harbor Laboratory**, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

SAYYARI, M; et al. Vapour treatments with methyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates. **Food Chemistry**, 124:964–970, 2011.

SCHWAB, W; RIKANATI, R.D; LEWINSOHN, E. Biosynthesis of plant-derived

flavor compounds. **The Plant Journal**. 54, 712-732, 2008.

SIMKIN, A.; et al. The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. **Plant J**. 40, 882-892, 2004.

SIVAKUMAR, D; WALL, M.M. Papaya Fruit Quality Management during the Postharvest Supply Chain. **Food Reviews International**, 29 (1): 24-48, 2013.

SIVASANKAR, S., SHELDRIK, B., ROTHSTEIN, S.J. Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. **Plant Physiol**. 122:1335-1342, 2000.

SCHIE, C.C.N; HARING, M.A; SCHUURINK, R.C. Tomato linalool synthase is induced in trichomes by jasmonic acid. **Plant Mol Biol**. 64:251–263, 2007.

SOARES, A.M.S; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização Química e espécies reativas de oxigênio. **Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. 1 (1): 9, 2007.

ROBERTS, S.C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. **Nature Chemical Biology**, 3: 387 – 395, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

The Good Scents Company. Disponível em: <<http://www.thegoodscentscompany.com/search.html>>. Acesso em: 06. ago. 2013.

WANG, C.Y., BUTA, G. Methyl jasmonate reduces chilling injury in *Curcubita pepo* through its regulation of abscisic and polyamine levels. **Environ. Exp. Bot**. 43: 427-432, 1994.

WANG, K.; et al. Methyl Jasmonate reduces decay and enhances antioxidant capacity in chinese bayberries. **J. Agric. Food Chem.**, 57: 5809–5815, 2009.

XIONG, et al. Ultrasensitive Determination of Jasmonic Acid in Plant Tissues Using High performance Liquid Chromatography with Fluorescence, **J. Agric. Food Chem.**, 2012.