

PRODUÇÃO DE ETILENO E ATIVIDADE DA ENZIMA ACCoxidase EM FRUTOS DE MARACUJÁ-AMARELO (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)¹

LARISSA MACEDO WINKLER², MARGUERITE QUOIRIN³, RICARDO AYUB⁴, CÉSAR ROMBALDI⁵, JORGE SILVA⁶

RESUMO – O maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) é uma das principais espécies cultivadas do gênero *Passiflora*. Seus frutos são ricos em minerais, vitaminas e apresentam aroma e sabor agradáveis. O presente trabalho teve como objetivos determinar a produção de etileno e atividade enzimática da ACCoxidase (ACCO) em maracujá-amarelo colhido em diferentes estádios de maturação. A determinação do estágio de maturação foi realizada com o auxílio de um colorímetro, que, por meio da radiação ultravioleta, estabeleceu valores absolutos da cor dos frutos de cada um dos grupos (I, II e III). A produção de etileno e a atividade da ACCoxidase foram realizadas por cromatografia gasosa. Os frutos do grupo I são predominantemente verdes, de acordo com os valores absolutos da cor obtidos. Os frutos do grupo II são predominantemente, coloridos, ou seja, em um estágio de maturação intermediário, e os frutos do grupo III, totalmente coloridos, apresentando-se, portanto, em início da senescência. Os frutos do grupo I apresentaram atividade da ACCO predominantemente mais elevada do que os frutos do grupo III, ocorrendo também o mesmo comportamento com a produção de etileno, com um valor médio de 7,25 nL. g⁻¹. h⁻¹, bem acima do nível máximo estabelecido para espécies classificadas como fracamente produtoras de etileno (0,5 nL. g⁻¹. h⁻¹). Assim, o maracujá-amarelo difere quanto à produção de etileno e atividade da enzima ACCO, de acordo com o estágio de maturação. A espécie foi considerada, em comparação com outras espécies, como produtora intermediária de etileno. A atividade enzimática da ACCO é mais elevada em frutos predominantemente verdes, mas ela é limitada e necessita de co-fatores enzimáticos para sua atividade máxima.

Termos para indexação: Maracujá-amarelo, etileno, ACCO.

ETHYLENE PRODUCTION AND ACCoxidase ACTIVITY IN PASSION FRUITS (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)

ABSTRACT- Passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) is one of the main cultivated species of *Passiflora* genus. Its fruits are rich in mineral salts and vitamins and to present agreeable aroma and flavour. The purpose of this work was to determine ethylene production and enzymatic activity of ACC oxidase (ACCO) in yellow passion fruit cropped in different maturation stages. The determination of maturation stage was effected with the help of a colorimeter that established the absolute value of fruit colour, using UV light, and classified the fruits into three groups (I, II, III). Ethylene production and ACC oxidase activity were measured by gaz chromatography. Fruits in group I, predominantly green, those in group II, as predominantly coloured, which means in an intermediary state of maturation, and those in group III, totally coloured, at the beginning of senescence. ACC oxidase activity was detected in predominantly green fruits, with values higher than those encountered in mature fruits. Higher ethylene production was also found in fruits of group I, with a mean value of 7,25 nL. g⁻¹. h⁻¹, in relation to the maximum level established for species classified as poor producers of ethylene (0,5 nL. g⁻¹. h⁻¹). These results show that the ethylene production and ACC oxidase activity of passion fruits are related to their maturation stage. In comparison with other species, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* was considered as an intermediary producer of ethylene. The activity of ACC oxidase enzyme was higher in predominantly green fruits, but was limited and needs enzymatic co-factors for its maximum activity.

Index terms: Passion fruit, ethylene, ACCO.

INTRODUÇÃO

Os frutos, em se tratando da produção de CO₂, são classificados em dois grupos: climatéricos e não-climatéricos. No processo de maturação dos frutos climatéricos, ocorre um aumento significativo na taxa respiratória e na produção de etileno. O maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) é um fruto climatérico (Kader *et al.*, 1989).

O etileno é um gás, um hidrocarboneto (C₂H₄), que atua como fitormônio, desempenhando um papel importante na regulação do processo deteriorativo intrínseco da planta. Ele controla muitos estádios do desenvolvimento da planta, tais como, maturação de frutos climatéricos, senescência de folhas e flores. Sua síntese autocatalítica é fortemente estimulada por fatores exógenos, como infecções fúngicas e/ou bacterianas, injúrias mecânicas, estresses hídrico, térmico e salino, e também por outros fitormônios (Theologis *et al.*, 1992; Bouzayen *et al.*, 1997; Zimmer, 1998).

A via de biossíntese do etileno foi descrita por Yang e Hoffman (1984). O aminoácido metionina é o precursor biológico do etileno em todas as plantas superiores, e é convertido em etileno pela via de biossíntese que compreende dois passos com reações enzimáticas. Na primeira reação, o S-adenosil-metionina (SAM) é convertido em ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) pela ação da enzima ACC sintetase (ACCS). O ACC é então metabolizado pela enzima ACCoxidase (ACCO), por uma reação de oxidação que necessita de O₂ e ferro, e que

é ativada pelo CO₂ para produzir etileno. Outra importante reação é o chamado ciclo de Yang, que recupera o enxofre e resintetiza o SAM. Em alguns casos, o etileno regula sua própria produção, induzindo a uma nova síntese de ACCS e ACCO. O ACC, precursor imediato do etileno, pode ser convertido ainda em malonil-ACC sob a ação da enzima N-maloniltransferase (NMT) e então transportado nessa forma para os vacúolos (Theologis *et al.*, 1992; Grierson, 1998).

Ververides e John (1991) extraíram e determinaram a atividade da ACCO *in vitro*, por uma analogia feita entre a ACCO e a enzima flavonona hidrolase. Métodos indiretos de extração permitiram determinar que o O₂, Fe⁺⁺, CO₂ e o ascorbato são co-fatores da ACCO.

Visando a elucidar o processo de maturação dos frutos de maracujá-amarelo, o presente trabalho teve como objetivo determinar a produção de etileno e a atividade enzimática da ACCO em maracujá-amarelo colhido em três estádios de maturação.

MATERIALE MÉTODOS

O maracujá-amarelo foi analisado em um colorímetro (MINOLTA CORPORATION[®]) a fim de determinar, por meio da radiação ultravioleta, valores absolutos da cor de cada um dos grupos, identificados pela numeração: I, II e III. Esta técnica facilita a classificação dos frutos em relação ao estágio de maturação. Estes estádios foram recentemente determinados pelo CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns

1 (Trabalho 201/2001). Recebido: 12/12/2001. Aceito para publicação: 10/10/2002.

2 Dr.^a, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

3 Dr.^a, Prof.^a do Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná.

4 Dr. Prof. Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR.

5 Prof.(s), Dr. (s), Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

6 Prof.(s), Dr. (s), Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Gerais de São Paulo). O grupo I caracteriza-se pelo fruto ainda verde. O grupo II é um estágio intermediário, onde o fruto apresenta uma coloração mais amarelada e aroma característico. Em relação ao grupo III, o fruto já apresenta características de senescência, coloração amarelada-vermelhada intensa e aspectos de murcha. Três frutos de cada grupo, provenientes da região de Pelotas-RS, foram analisados. Cada fruto foi marcado em oito partes iguais, com auxílio de um pincel atômico, e a média destas leituras resultou em um valor absoluto de cor. A variável luminosidade (L) varia de zero (preto total) a 100 (branco total); é a opacidade da cor, ou seja, quanto é mais escuro ou mais claro. A outra variável é designada como “a”, que varia de -200 (verde) até +200 (vermelho), “b” que varia de -200 (azul) a +200(amarelo).

Para a análise da produção de etileno, utilizou-se maracujá-amarelo colhido em três estádios de maturação: I, II e III. A produção de etileno foi determinada por cromatografia gasosa, em cromatógrafo Varian 3300. Três frutos de cada grupo foram pesados e acondicionados em três baldes plásticos com capacidade para 5L. Após 1 h, foi coletado 1 mL da atmosfera gasosa, com auxílio de uma seringa hipodérmica, determinando-se a produção de etileno. Uma segunda leitura foi realizada após 2 h. Os resultados foram expressos em nL. g⁻¹. h⁻¹.

A atividade enzimática da ACCO foi determinada através da produção de etileno obtida após 1 h de incubação do suco dos frutos a 22°C-25°C. Foi utilizado um fruto de cada grupo para a análise. Duas soluções foram utilizadas, o *mix* 1, com 250 µL do extrato ACC; sulfato ferroso (FeSO₄) 10 µM; ascorbato de sódio 30 mM; bicarbonato de sódio 30 mM, diluídos em tampão Tris-HCl 100 mM, para um volume final de 20 mL. O *mix* 2, contendo as mesmas soluções, porém sem adição do extrato de ACC, constituiu o primeiro controle da reação. O segundo controle foi feito apenas com o extrato protéico dos frutos. Foram utilizados frascos com capacidade para 10 mL. Para cada grupo, foram feitas três repetições com ACC e três sem ACC (controle 1), mais uma repetição para o segundo controle. Em cada frasco, foram adicionados 1 mL do *mix* e 1 mL do suco extraído da polpa dos frutos. Os frascos foram mantidos sob agitação por 15 min em um agitador do tipo orbital. Após este período, foi feita uma aeração com um aparelho nebulizador. Os frascos foram novamente fechados e mantidos sob agitação por uma hora. Em seguida, procedeu-se a coleta de 1 mL da atmosfera gasosa. A produção de etileno foi expressa em nL.g (DUPPILLE *et al.*, 1993).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três frutos do grupo I foram identificados como sendo predominantemente verdes, de acordo com os valores absolutos obtidos. Os frutos do segundo grupo foram classificados como predominantemente coloridos, ou seja, em um estágio intermediário da maturação, e os frutos do terceiro grupo foram identificados como totalmente coloridos, apresentando-se, portanto, em início da senescência (Tabela 1). Com base nestes resultados, foi realizada a avaliação da produção de etileno.

TABELA 1 - Valores absolutos da cor de frutos comerciais de maracujá-amarelo, classificados em três grupos: predominantemente verde, predominantemente colorido e totalmente colorido, obtidos por colorimetria.

Grupos	Valor L	Valor a	Valor b
Predominantemente verde	58,29	-7,76	+40,59
Predominantemente colorido	73,57	+0,12	+48,39
Totalmente colorido	74,89	+3,06	+57,45

L= luminosidade; a= variação na cor entre verde e vermelho; b= variação na cor entre azul e amarelo.

A atividade da enzima ACCO, em maracujá predominantemente verde, mostrou-se superior em relação aos frutos maduros. Maior produção de etileno foi encontrada também para estes frutos, com um valor médio de 7,25 nL. g⁻¹. h⁻¹, bem acima do nível máximo estabelecido para espécies classificadas como fracamente produtoras de etileno (0,5 nL. g⁻¹. h⁻¹) (Abeles *et al.*, 1992). Por outro lado, nestes frutos, a adição de ACC (250 µM) ao extrato solúvel triplicou a atividade da ACCO, que passou de 10,10 nL. g⁻¹. h⁻¹ para 37,84 nL. g⁻¹. h⁻¹ indicando que a produção de etileno ainda é limitada pela concentração de substrato e que os co-fatores sulfato ferroso, ascorbato de sódio e bicarbonato de sódio foram necessários para a obtenção da atividade máxima da enzima ACCO na reação (Tabela 2).

TABELA 2 – Produção de etileno e atividade da enzima ACCO em frutos de maracujá-amarelo, determinada após 1 e 2 horas, por cromatografia gasosa.

Estádio de maturação	Média produção etileno após 1 e 2 h (nL.g ⁻¹ .h ⁻¹)	Média atividade da ACCO com ACC após 1 h (nL/g)	Média atividade da ACCO sem ACC após 1 h (nL/g)	Testemunha (nL/g)
Predominantemente verde	7,25	37,84	10,10	1,17
Predominantemente colorido	5,43	23,70	4,50	1,62
Totalmente colorido	5,24	22,69	3,94	0,18

Com a obtenção destes resultados, foi possível determinar que o maracujá-amarelo difere quanto à produção de etileno e atividade da enzima ACCO, de acordo com o grupo de maturação. Todos os frutos climatéricos sintetizam etileno no início da maturação e este fitormônio induz a expressão de genes responsáveis pelos atributos qualitativos do fruto, cor, aroma e sabor, fortemente representado neste estudo pelos grupos I, II e III. Alterações na cor do fruto podem ocorrer pela perda de clorofila nos plastídios, manifestando carotenóides amarelos, alaranjados ou vermelhos. Alterações na textura, como o aspecto de murcha apresentado pelo fruto do grupo III, estão associadas com alterações na parede celular, onde atuam enzimas como poligalacturonase, celulase e galactanase, alterando a solubilidade e hidratação da parede celular, caracterizando um estágio mais avançado de maturação e senescência (GRIERSON, 1998). No presente estudo, o maracujá-amarelo foi considerado produtor intermediário de etileno em comparação com outras espécies, assemelhando-se a algumas cultivares de tomate, maçã, melão, pêssego, pêra, ameixa, caqui e kiwi (ZIMMER, 1998). Outros estudos mostraram que existem diferenças para a produção de etileno e atividade da ACCO entre espécies do gênero *Passiflora*. Um estudo realizado com frutos de maracujá-roxo (*P. edulis* Sims) mostrou que a produção de etileno (0,12 nmol etileno.g⁻¹.h⁻¹), conteúdo de ACC e atividade da enzima ACCS foram baixos no estágio inicial de maturação (grupo I). Estes resultados indicaram que esta espécie apresenta a mesma rota de biossíntese de etileno de outros frutos climatéricos e que a atividade da enzima ACCS é limitada. Por outro lado, a atividade da enzima ACCO encontrada neste estudo foi elevada e superior à de outras espécies. Estes níveis elevados resultam na produção de grandes quantidades de etileno durante a pós-colheita de frutos (SHIOMI *et al.*, 1996). Entre os fatores relacionados à pós-colheita, o principal é a perda de água, fazendo com que a vida útil pós-colheita seja muito variável, de no máximo uma semana em boas condições e uns 10 a 15 dias com aspecto de murcho (grupo III), favorecendo muitas vezes o ataque de pra-

gas e doenças, além de diminuir a resistência ao transporte e armazenamento.

CONCLUSÃO

A espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* é considerada, em comparação com outras espécies, produtora intermediária de etileno. A atividade enzimática da ACCO é maior em frutos predominantemente verdes, classificados desta forma por colorimetria, mas ela é limitada e necessita de co-fatores para sua atividade máxima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT, M. E. Jr. **Ethylene in plant biology**. 2. ed. San Diego: San Diego Academic Press, 1992. 414p.
- BOUZAYEN, M.; FERRER, M.; GUILLEN, P.; AYUB, R.; BIDONDE, S.; BEN AMOR, M.; GUIZ, M.; RAMASSAMY, S.; ZEGZOUTI, H.; PECH, J. C.; LATCHÉ, A. A ACC oxidase gene family: characterization and down-regulation by genetic manipulation. **Phytochemistry of Fruit and Vegetables**, Oxford, p.243-250, 1997.
- DUPPILLE, E.; ROMBALDI, C. V.; LELIEVRE, J. M.; CLEYET-MAREL, J. C.; PECH, J. C.; LATCHÉ, A. Purification, properties and partial amino-acid sequence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase from apple fruits. **Planta**, Heidelberg, v.190, p. 65-70, 1993.
- GRIERSON, d. Manipulation of fruit ripening by genetic modification. **Transgenic Plant Research**, Durham, p. 109-124, 1998.
- KADER, A. A.; ZAGORY, D.; KERBEL, E. L. Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Davis, Califórnia, 29p., 1989.
- SHIOMI, S.; KUBO, Y.; WAMOCHO, L. S.; KOAZE, H.; NAKAMURA, R.; INABA, A. Postharvest ripening and ethylene biosynthesis in purple passion fruit. **Postharvest biology and technology**, Netherlands, Amsterdam, v.8, p. 199-207, 1996.
- THEOLOGIS, A.; ZAREMBINSKI, T. I.; OELLER, P. W.; LIANG, X.; ABEL, S. modification of fruit ripening by suppressing gene expression. **Plant Physiology**, Bethesda, v.100, p.549-551, 1992.
- VERVERIDIS, P.; JOHN, P. Complete recovery in vitro of ethylene forming enzyme activity. **Phytochemistry**, Oxford, v.30, p.725-727, 1991.
- YANG, S. F.; HOFFMAN, N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 35, p.155-189, 1984.
- ZIMMER, P. D. **Caracterização parcial da ACC (ácido 1-carboxílico 1-aminociclopropano) oxidase em frutos climatéricos**. 1998. 41f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)- Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1998